

**Universidade de Lisboa**

**Faculdade de Ciências**

**Departamento de Biologia Animal**



**Diversidade de microsporídeos (Microsporidia)  
em cochonilhas (Homoptera; Pseudococcidae;  
*Planococcus citri*) praga de citrinos**

**Lúcia Alexandra Porto Góis**

**Mestrado em Ecologia e Gestão Ambiental**

**Lisboa**

**2008**

**Universidade de Lisboa**  
**Faculdade de Ciências**  
**Departamento de Biologia Animal**



**Diversidade de microsporídeos (Microsporidia)  
em cochonilhas (Homoptera; Pseudococcidae;  
*Planococcus citri*) praga de citrinos**

**Lúcia Alexandra Porto Góis**

**Orientadora: Professora Doutora Maria Teresa Rebelo**

**Mestrado em Ecologia e Gestão Ambiental**

**Lisboa**

**2008**

## **Agradecimentos**

Este trabalho não teria sido possível sem a ajuda e apoio de inúmeras pessoas, para as quais um agradecimento escrito nunca será suficiente, pelo papel crucial que desempenharam no trabalho a que me propus.

À minha Orientadora, a Professora Doutora Maria Teresa Rebelo, que sempre me apoiou nos bons e maus momentos, que me motivou para a área de gestão de pragas não só durante o período de mestrado mas também como docente da disciplina de Ecologia e Gestão de Pragas, e que com o seu profissionalismo e boa disposição me permitiu apreciar esta “viagem”. Obrigada.

Ao Professor Catedrático Carlos Azevedo do ICBAS pela inspiração para a área da Microbiologia, pelos ensinamentos e conselhos, pela paciência e simpatia com que sempre respondeu às minhas dúvidas, os meus humildes agradecimentos.

Ao Engenheiro José Carlos Franco do ISA, que me facultou o acesso ao mundo dos citrinos em Portugal, os meus agradecimentos.

À Engenheira Leonor Campos do ISA, minha companheira de todas as aventuras de Mestrado, por todo o apoio inimaginável, solidariedade, profissionalismo e amizade. Um “muito obrigada” nunca seria suficiente.

Ao Telmo da Unidade de Microscopia de Varrimento da FCUL, agradeço as sessões de microscopia e o bom humor.

Ao Sr. Octávio Chaveiro da Estação Agronómica Nacional, por demonstrar que ainda existem boas pessoas neste mundo, e por me ter facilitado o treino no ultramicrotomo da EAN.

À Marisa Pardal, técnica da Unidade de Histologia do Instituto Gulbenkian para a Ciência, pelo profissionalismo, disponibilidade e amabilidade com que sempre me recebeu e acompanhou na fase final do meu trabalho laboratorial.

À Professora Doutora Maria da Luz Mathias da FCUL por me ter possibilitado o uso da estufa e centrífuga do seu laboratório.

À Professora Doutora Ana Amorim do Instituto de Oceanografia por me ter facultado o sistema de filtração utilizado numa etapa do protocolo.

À Engenheira Elsa Borges da Silva e ao Sr. Cariano, ambos do ISA, por me terem ensinado a procurar e distinguir as cochonilhas no campo.

Ao Engenheiro Celestino Soares da Direcção Regional de Agricultura e Pescas do Algarve (Patação) por me ter auxiliado na DRAPALG e pela prontidão da ajuda quando solicitada. Obrigada.

Ao Gabriel Martins da FCUL pelas “dicas” na Microscopia Óptica.

À Dra. Vitória Marabuto, por me ter ajudado não só quando me faltou um reagente essencial no protocolo, mas também quando precisei duma palavra amiga.

Ao Museu da Cidade por me ter autorizado a estudar o seu pomar de citrinos.

À Rita Martins, minha amiga querida, pela busca de cochonilhas em Leiria, pela ajuda na resolução dos incontáveis problemas burocráticos que surgiram e sobretudo pela amizade.

À Inês Órfão, por estar sempre comigo e por me fazer sair da “concha” nos piores momentos e ainda me fazer rir, mesmo quando me intoxiquei com um produto no laboratório.

Ao Eduardo, por tudo. Não há palavras que possam descrever o quanto lhe devo, pois mais que ninguém, passou juntamente comigo pelos bons e maus momentos que vivi nestes últimos dois anos.

Aos meus pais, pelo incentivo e apoio total que deles recebi, por terem sofrido e rido comigo ao longo deste processo durante o qual cresci. A eles lhes dedico este trabalho, assim como à minha avó e ao meu tio, duas pessoas que tive a infelicidade de perder durante o mestrado. A sua memória perdura comigo, eternamente.

## **Diversidade de microsporídeos (Microsporidia) em cochonilhas (Homoptera; Pseudococcidae; *Planococcus citri*) praga de citrinos**

### Resumo

A cochonilha-algodão, *Planococcus citri* (Risso, 1813) é uma das pragas-chave dos citrinos em Portugal. A luta biológica contra esta praga apesar de, largamente desenvolvida em inúmeros programas a nível mundial, nunca recorreu a entomopatogéneos. Entre estes, os Microsporidia (Filo Microspora) constituem importantes factores de regulação das populações de insectos e poder-se-ão revelar fulcrais no controlo de certas populações-praga. No entanto, são necessários estudos sobre a sua diversidade e interacção com os hospedeiros e capacidade de utilização em controlo biológico.

A importância da citricultura em Portugal e na Bacia do Mediterrâneo em geral, o prejuízo que as explosões populacionais de cochonilha-algodão aí provocam, e o provável controlo biológico atribuído aos microsporídeos, representaram o cerne deste trabalho. Assim, este apresenta-se como preliminar no rastreio e descrição da fauna de Microsporidia patogéneos de *Planococcus citri*, para daí se poderem tirar conclusões do ponto de vista de limitação natural e controlo biológico das populações, e contribuir para uma gestão mais sustentada dos recursos em meio agrícola.

Ao verificar-se a ausência de espécies do Filo Microsporidia em *Planococcus citri*, este trabalho enfatiza a descrição de um protocolo metodológico inédito que, aperfeiçoado, possibilite ser utilizado na identificação deste grupo de patogéneos no hospedeiro *Planococcus citri* em estudos futuros.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Planococcus citri*, Microsporidia, luta biológica, inimigos naturais

# **Diversity of microsporidia (Microsporidia) in mealybugs (Homoptera; Pseudococcidae; *Planococcus citri*) pests of citrus orchards**

## Abstract

The citrus mealybug, *Planococcus citri* (Risso, 1813) is one of the key-pests of Portuguese citrus orchards. Biological control used against this pest species, in spite of widespread in several worldwide programs has never used entomopathogens. Among these, the Microsporidia (Phylum Microspora) are important regulators of insect populations and may reveal to be keystones in the refrain of some pest populations. However, we still lack studies concerning their diversity and interaction with their hosts and their ability to be used in biological control.

The importance of citriculture in Portugal and the Mediterranean Basin, the adverse effects of citrus mealybug population explosions in this crop and the probable biological control attributed to microsporidia are in the origin of this work. Therefore, it comes as preliminary in the screening and description of the Microsporidia fauna parasitizing *Planococcus citri*, in order to take conclusions about the natural limitation and biological control of these populations, contributing towards a more sustainable management of resources in agriculture environments.

Despite the absence of microsporidian species found in *Planococcus citri* during this work, its outputs are keystone in the establishment of an original protocol which, enhanced, may be used in the future in the identification of this group of pathogens on the host *Planococcus citri*.

**KEY WORDS:** *Planococcus citri*, Microsporidia, biological control, natural enemies

# Índice Geral

<b>Capítulo 1 – Introdução</b>	1
1.1- As pragas no contexto da agricultura mundial	2
1.2- A citricultura	3
1.3- As pragas dos citrinos	4
1.4- A cochonilha-algodão ( <i>Planococcus citri</i> )	5
1.4.1- Sistemática, morfologia e biologia	5
1.4.2- Relação com a planta hospedeira	7
1.5- A luta biológica contra <i>Planococcus citri</i>	8
1.5.1 – Perspectiva histórica da luta biológica contra <i>Planococcus citri</i>	8
1.5.2 – A luta biológica: os entomopatogéneos	9
<b>Capítulo 2 – Os Microsporidia</b>	10
2.1- O Filo Microsporidia	11
2.1.1- Sistemática, morfologia e ciclo de vida	12
2.1.2- Relação com o hospedeiro	13
2.2- A Luta Biológica com Microsporidia	14
2.2.1- Programas de luta biológica	14
2.2.2- Vantagens e desvantagens do uso de Microsporidia na luta biológica	15
2.3- Objectivos	17
<b>Capítulo 3 – Metodologia</b>	18
3.1- A captura de <i>Planococcus citri</i> no campo	19
3.1.1- Prospekção de <i>Planococcus citri</i>	20
3.1.2- Caracterização das populações de <i>Planococcus citri</i>	22
3.2- Manutenção de populações de <i>Planococcus citri</i> em laboratório	23
3.3- Prospekção de microsporídeos em <i>Planococcus citri</i>	24
3.3.1- Preparação de <i>Planococcus citri</i> para microscopia electrónica	25
3.3.2- Colheita e fixação dos tecidos	25
3.3.3- Desidratação	27
3.3.4- Impregnação	28
3.3.5- Inclusão	29
3.3.6- Ultramicrotomia (seccionamento) e contrastação	30
3.4- Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM)	32
<b>Capítulo 4 – Resultados e Discussão</b>	34
4.1- Captura de <i>Planococcus citri</i> e manutenção das populações em laboratório	35
4.2- Prospekção de microsporídeos em <i>Planococcus citri</i>	37
<b>Considerações finais</b>	40
<b>Referências</b>	41
<b>Anexos</b>	50
Anexo I	50
Anexo II	51

## Índice de Figuras

Figura 1: Pormenor das ceras que cobrem o corpo de <i>Planococcus citri</i> em microscópio electrónico de varrimento (ampliação: 7500x). (Foto: L. Góis).....	5
Figura 2: Aglomerado de fêmeas adultas, estados ninfaís e sacos ovíferos de <i>Planococcus citri</i> . (Foto: E. Marabuto).....	6
Figura 3: Constituição geral do esporo de Microsporidia (adaptado de Keeling & Fast, 2002). .....	13
Figura 4: Hospedeiros citrícolas de <i>Planococcus citri</i> . (Fotos: L. Góis).....	14
Figura 5: (1) Excreção de melada. (2) Fumagina. (Fotos: (1) E. Marabuto; (2) Anónimo).....	20
Figura 6: Locais de amostragem. (1) Museu da Cidade (38°45'31.51"N e 9°9'23.76"O), (2) Gândara dos Olivais (39°46'31.47"N e 8°49'30.04"O), (3) Santa Iria de Azóia (38°50'20.54"N e 9°5'30.84"O), (4) DRAPALG, Patação (37°2'55.50"N e 7°56'59.66"O), (5) Centro de Experimentação Agrária de Tavira (37°7'15.17"N e 7°39'16.55"O), (6) Instituto Superior de Agronomia (38°42'26.05"N e 9°10'56.26"O), (7) Algez (37°12'12.88"N e 8°18'21.57"O). .....	21
Figura 7: Ciclo de vida de <i>Planococcus citri</i> . (1) Sacos ovíferos. (2) Fêmeas de 1º instar. (3) Fêmeas de 2º e 3º instares. (4) Fêmea adulta. (Fotos: E. Marabuto).....	24
Figura 8: Amostras das quatro populações em estudo. (Foto: L. Góis).....	25
Figura 9: Pós-fixação com tetróxido de ósmio. (Foto: L. Campos).....	27
Figura 10: Desidratação com série ascendente de etanol a 7 concentrações. (Foto: L. Góis).....	28
Figura 11: (1) Moldes para cápsulas de Epon. (2) Formação de cápsulas de Epon. (Fotos: L. Góis).....	30
Figura 12: Ultramicrótomo LKB 2128 da Estação Agronómica Nacional. (Foto: L. Góis).....	31
Figura 13: (1) Sistema de filtração Swinnex ligado a uma seringa. (2) Filtração das amostras através do filtro no interior do sistema de filtração. (Fotos: L. Góis).....	32
Figura 14: (1) Filtros colados em stubs para SEM. (2) Metalizador JFC-1200. (Fotos: L. Góis) .....	33
Figura 15: Microscópio Electrónico de Varrimento JEOL JSM-5200 LV. (Foto: L. Góis).....	33
Figura 16: Macho de <i>Anagyrus pseudococci</i> (Girault) (Hymenoptera: Encyrtidae), endoparasitóide de <i>Planococcus citri</i> (Risso) (Homoptera: Pseudococcidae). (Foto: E. Marabuto).....	36



# **Capítulo 1 – Introdução**

## 1.1- As pragas no contexto da agricultura mundial

Desde os primórdios da agricultura há cerca de 10000 a.C. que o Homem compete pelos recursos com vários grupos de organismos (animais, patogéneos e infestantes), designados colectivamente como pragas (Oerke, 2005), aos quais se atribui a perda anual de 10-12% da produção agrícola (Samways, 1997). A necessidade de fomentar a produção agrícola mundial capaz de suportar uma população global em crescimento (Amaro & Baggiolini, 1982) tem vindo a exigir a conversão dramática dos ecossistemas naturais para uso humano, destruindo-se florestas, solos e eliminando-se espécies vegetais e animais, de forma a corresponder a uma crescente necessidade de alimento (Van Driesche & Bellows, 1996).

Após a Segunda Guerra Mundial e devido à escassez de alimento, o uso global de pesticidas químicos disparou, particularmente com a descoberta do DDT (Dicloro-Difenil-Tricloroetano), intensamente utilizado na década de 40 do século XX (Rose, 1988). Inicialmente, os pesticidas demonstraram a sua eficácia em muitos casos, especialmente no controlo de infestantes e patogéneos das plantas (Oerke, 1995), mas o seu uso excessivo ou mal direccionado revelou-se problemático a diversos níveis tais como falhas no controlo efectivo das pragas, contaminação do meio ambiente, danos na saúde humana e declínio da biodiversidade dos ecossistemas (Hufakker, 1988; Lacey & Shapiro-Ilan, 2003).

Desde 1945 que se tem vindo a registar um acréscimo dramático no número de animais (principalmente insectos), infestantes e patogéneos de plantas resistentes aos pesticidas (Brent, 1987) e, apesar do uso destes ter aumentado, as perdas nas colheitas agrícolas devido às pragas não diminuíram (Oerke, 1995). Estima-se que apenas 0,1% dos pesticidas aplicados no controlo de pragas atingem a praga-alvo a que se destinam (Pimentel, 1995).

No final da década de 60 do século passado as perdas nas colheitas devido aos insectos rondavam os 13%, aos patogéneos das plantas os 12% e às infestantes 10% (Cramer, 1967). A resistência desenvolvida nas populações-praga, o ressurgimento das mesmas e de pragas secundárias enfatizou a ineficácia dos pesticidas no controlo de pragas (Huffaker, 1988). A utilização de pesticidas pode despoletar o aumento das pragas pelo desenvolvimento de processos de resistência, mas também pela destruição dos seus inimigos naturais (Trichilo & Wilson, 1993).

Considerando a nocividade de alguns insectos na agricultura (Bravo & Soberón, 2008) é crucial incrementar o conhecimento sobre as componentes dos ecossistemas agrícolas, de forma a impedir ou minimizar o ataque massivo de insectos que ponham em causa a produção agrícola (Dent, 1991).

## 1.2- A citricultura

No contexto da agricultura mundial, a citricultura é uma das actividades com maior importância económica (Silva, 1997). Os citrinos são plantas angiospérmicas oriundas do sudeste tropical e subtropical da Ásia, pertencentes à família Rutaceae (Agustí, 2000). Esta família engloba inúmeros géneros, mas é o género *Citrus* o que revela uma maior utilidade para o Homem. O número de espécies deste género varia consoante o sistema taxonómico escolhido, e inclui inúmeras espécies selvagens e variantes híbridas que ao longo do tempo foram seleccionadas para o cultivo, das quais se destacam os citrinos como a laranja, o limão, a toranja, a lima e a tangerina (Mabberley, 1997).

A Bacia do Mediterrâneo é considerada a primeira entidade citrícola mundial (Aubert, 1994), e crê-se que a distribuição global dos citrinos está relacionada com a sua introdução neste local por volta de 300 a.C., primeiramente do citrão (*Citrus medica* L.), seguindo-se no século XV a laranja-azeda (*Citrus aurantium* L.), o limão (*Citrus limon* (L.) Burm.) e a laranja-doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) (Carvalho *et al.*, 1996).

Em Portugal, a cultura de citrinos em larga escala é uma das mais antigas (Silva, 1951) e está referenciada desde o século XVI com a exportação de laranja-doce (*Citrus sinensis*), sendo já uma próspera actividade nos finais do século XVIII e princípios do século XIX, principalmente na região de Setúbal (Amaro, 1994a). A importância deste sector económico aumentou ao longo do século XX, desenvolvendo-se proeminentemente na região do Algarve, que representa 75% da produção total do Continente (INE, 2007). Os citrinos constituem 31% da produção total de frutos frescos de Portugal Continental (INE, 2007), havendo um maior cultivo da laranjeira-doce, do limoeiro e da tangerineira *Citrus reticulata* Blanco (Carvalho, 1990).

### 1.3- As pragas dos citrinos

Não sendo os citrinos endêmicos da Bacia Mediterrânica, existe uma enorme variedade de insectos nesta zona, introduzidos accidental ou intencionalmente (Katsoyannos, 1993), e que constituem um complexo com mais de 60 espécies de pragas de citrinos (Viggiani, 1988). A mosca-do-Mediterrâneo *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) (Katsoyannos *et al.*, 1996), a traça-do-limoeiro *Prays citri* (Millière) (Lepidoptera: Yponomeutidae) (Martins *et al.*, 2002) e a mosquinha-branca *Dialeurodes citri* (Ashmead) (Homoptera: Aleyrodidae) (Argov *et al.*, 2003) são apenas algumas das mais prejudiciais na zona mediterrânica.

É, no entanto, de salientar, que as pragas dos citrinos na região Mediterrânica pertencem na sua maioria à ordem Homoptera (Katsoyannos, 1993), destacando-se a família Pseudococcidae – insectos vulgarmente designados por **cochonilhas** (Franco *et al.*, 2000). As cochonilhas no seu todo são os insectos que a nível mundial causam maiores prejuízos em citrinos, anualmente na ordem dos 42% (Carvalho, 1994). À escala mundial existem aproximadamente 61 espécies de pseudococcídeos em citrinos (Ben-Dov, 1994), e 20 espécies associadas aos citrinos do Mediterrâneo (Viggiani, 1988).

Em Portugal Continental, a entomofauna nociva não se distingue muito da que se encontra noutros locais da região Mediterrânica. Das cerca de 40 espécies de insectos que a constituem, apenas cerca de uma dúzia são pragas importantes e somente algumas têm elevada importância económica, constituindo pragas-chave (Carvalho, 1990). Destas, seis são cochonilhas: *Planococcus citri* (Risso), *Pseudococcus cryptus* (Hempel), *Pseudococcus longispinus* (Targioni-Tozzetti), *Pseudococcus calceolariae* (Maskell), *Pseudococcus viburni* (Signoret) e *Nipaecoccus viridis* (Newstead) (Franco *et al.*, 2000). Juntamente com *Planococcus citri*, *Pseudococcus calceolariae*, *P. affinis*, *P. longispinus* formam um complexo simpátrico de espécies (Franco, 1992), igualmente verificado noutros países da Bacia Mediterrânica (Franco & Carvalho, 1990).

Muitas das cochonilhas pertencentes ao género *Planococcus*, que engloba 39 espécies (Ben-Dov, 1994), são pragas de citrinos, da vinha (*Vitis vinifera*), da bananeira (*Musa spp.*), da figueira (*Ficus carica*), da romãzeira (*Punica granatum*) e de plantas ornamentais da Bacia Mediterrânica (Cox & Ben-Dov, 1986). A espécie mais comum no Mediterrâneo é a cochonilha-algodão ou cochonilha branca *Planococcus citri* (Risso,

1813) (Homoptera: Pseudococcidae), conhecida em todas as regiões biogeográficas (Berberan, 1949), e encontrada em todos os países do Mundo (Viggiani, 1988).

## 1.4- A cochonilha-algodão (*Planococcus citri*)

### 1.4.1 – SISTEMÁTICA, MORFOLOGIA E BIOLOGIA

Na sistemática dos pseudococcídeos recorre-se às características das fêmeas, devido à reduzida dimensão dos machos e à raridade com que são observados. Outra das razões é o facto dos estragos nas plantas hospedeiras resultarem da actividade alimentícia das fêmeas (Franco *et al.*, 2000), pelo que para este trabalho importa apenas descrevê-las no seu cômputo geral.

O posicionamento de *P. citri* nos *taxa* superiores suscita alguns desacordos na comunidade científica, mas adoptou-se pelo critério de Quartau (Quartau, 1984), segundo o qual *Planococcus citri* (Risso, 1813) pertence à ordem Homoptera, Subordem Sternorrhyncha, Super-família Coccoidea, Família Pseudococcidae, Sub-família Pseudococcinae, Género *Planococcus* (Ferris, 1950).

Esta espécie é vulgarmente denominada por cochonilha-algodão, algodão ou cochonilha-branca (Chaves, 1992), pois as características que melhor a identificam são as secreções cerosas brancas (Figura 1) que cobrem por completo o corpo das ninfas e fêmeas adultas (Downie & Gullan, 2004), assim como aspecto algodinoso formado pelos aglomerados de indivíduos e sacos ovíferos, e que lhes confere um aspecto farináceo e pulvurento (Figura 2) (Franco & Carvalho, 1990).

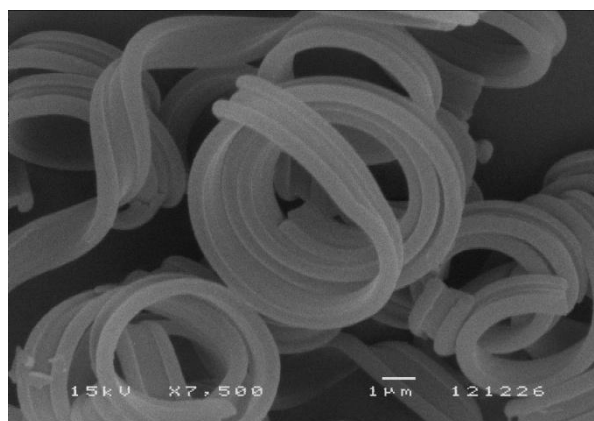


Figura 1: Pormenor das ceras que cobrem o corpo de *Planococcus citri* em microscópio electrónico de varrimento (ampliação: 7500x). (Foto: L. Góis)



Figura 2: Aglomerado de fêmeas adultas, estados ninfais e sacos ovíferos de *Planococcus citri*. (Foto: E. Marabuto)

As fêmeas são neoténicas nos três instares, i.e., as características morfológicas da fêmea adulta são semelhantes às dos estados imaturos (Franco *et al.*, 2000). O corpo é oval e achatado dorso-ventralmente, não possui asas dado que são sésseis nas fases de ninfa e fêmea adulta (Franco *et al.*, 2000; Downie & Gullan, 2004).

De hábitos relativamente sedentários, as fêmeas mantêm-se no mesmo hospedeiro durante todo o ciclo de vida e aí realizam a postura dos cerca de 200 ovos (Carvalho, 1994). Tratando-se duma espécie multivoltina, com várias gerações por ano, variáveis consoante as condições ecológicas de cada região (ex.: 3 a 5 gerações na região do Algarve), ocorre geralmente sobreposição de gerações na mesma planta hospedeira (Frescata, 2004). É eurimétrica, alimentando-se de várias partes da planta (Franco, 1992) e, apesar da escassa mobilidade, migra entre os vários órgãos da planta, estando sincronizada com sua a fenologia.

Do ponto de vista comportamental, a cochonilha-algodão revela um comportamento críptico, refugiando-se e abrigando-se em vários locais da planta, principalmente nas axilas das folhas e cálices dos frutos (Carvalho, 1994).

### 1.4.2 – RELAÇÃO COM A PLANTA HOSPEDEIRA

*Planococcus citri* é extremamente polífaga, existindo numa enorme variedade de plantas hospedeiras, principalmente dicotiledóneas, sendo praga de citrinos em todas as suas áreas de cultivo (Cox & Ben-Dov, 1986). *P. citri* pode ser encontrada em 146 espécies de plantas distribuídas por 60 famílias (Ben-Dov, 1994), das quais Leguminosae, Solanaceae e Rutaceae apresentam o maior número de hospedeiros. Para além dos citrinos, *P. citri* assume uma importância económica em culturas de estufa em zonas temperadas (Islam *et al.*, 1997), em manga (*Mangifera indica*) e cafeeiro (*Coffea spp.*) em zonas tropicais (Krishnamoorthy & Singh, 1987), no cacaueteiro (*Theobroma cacao*) no Brasil (Lenira *et al.*, 2002), em culturas de vinha (*Vitis vinifera*), de amoreira (*Morus alba*), de alfarrobeira (*Ceratonia siliqua*) e de plantas ornamentais em Portugal (Chaves, 1992). A laranjeira-doce *Citrus sinensis* é a planta mais atacada nas regiões central e oeste mediterrânica por *Planococcus citri* (Franco *et al.*, 2001).

A alimentação desta espécie fitófaga consiste essencialmente de seiva floémica com o auxílio dos estiletos da armadura bucal, o que resulta directamente em ataques localizados aos órgãos da planta (frutos, flores, ramos e folhas) e, indirectamente, na excreção de melada com intensos efeitos estéticos e patológicos (redução do valor comercial dos frutos e da taxa fotossintética) (Silva, 2000). Devido ao elevado potencial biológico da cochonilha-algodão e ao facto de se concentrar sobre os frutos em crescimento, leva-a assumir o estatuto de praga-chave na citricultura portuguesa, sendo sempre nociva, particularmente na região do Algarve (Guimarães, 1973; Carvalho, 1990).

Como foi anteriormente referido, a cochonilha-algodão apresenta uma estreita relação de dependência com o hospedeiro (Carvalho, 1994), revelando hábitos relativamente sedentários e mobilidade reduzida. Estas condicionantes, aliadas ao seu comportamento críptico – que as levam a refugiar em zonas menos acessíveis à aplicação de insecticidas – e à sua cobertura cerosa – que poderá constituir uma protecção contra estes – são factores que no seu conjunto proporcionam uma menor susceptibilidade de *Planococcus citri* em relação à luta química (Arnett, 1993), sendo a sua integração em programas de luta biológica a alternativa no combate a esta praga (Shewsbury *et al.*, 2002).

## 1.5- A luta biológica contra *Planococcus citri*

### 1.5.1 – PERSPECTIVA HISTÓRICA DA LUTA BIOLÓGICA CONTRA *PLANOCOCCUS CITRI*

A luta biológica consiste na regulação de populações de pragas recorrendo aos inimigos naturais (Gillott, 1980), algo que é efectuado em culturas citrícolas na região Mediterrânica há mais de 80 anos (Katsoyannos, 1993). O uso de inimigos naturais das pragas como forma de minimizar o seu impacto nocivo no ecossistema agrário é mais benéfico do que a aplicação de pesticidas, quando comparados os seus efeitos nos ecossistemas, na biodiversidade e na saúde humana (Carvalho, 1986), o que revela a inadequação da luta química no combate às pragas (Amaro & Baggiolini, 1982).

Muitas espécies reais e potenciais pragas são mantidas abaixo do nível prejudicial de ataque por vários predadores, parasitóides, patogéneos ou outros antagonistas, mas quando estes são destruídos dada a sua maior sensibilidade aos pesticidas (por estarem acima na cadeia alimentar), as populações-praga tendem a permanecer depois da aplicação do pesticida, sofrendo aumentos populacionais (Croft, 1990). São inúmeros os casos em que a limitação natural das pragas é eficaz, concluindo-se que mais de 99% das potenciais pragas de insectos se mantêm sob esse controlo (DeBach, 1974).

A luta biológica é compreendida em três vertentes: a luta biológica clássica, o tratamento biológico ou inoculativo e a limitação natural ou conservação (Figueiredo, 1997).

A nível europeu, Portugal foi pioneiro na luta biológica clássica, com o exemplo do combate à cochonilha-australiana ou icéria (*Icerya purchasi* Mask., 1878) (Homoptera: Margarodidae), quando perante a ineficácia da luta química, se importou da Califórnia a vedália (*Rodolia cardinalis* Muls., 1850) (Coleoptera: Coccinellidae) em 1897 por indicações de Veríssimo de Almeida (Silva, 1951). Relativamente à luta biológica clássica contra *Planococcus citri*, a primeira referência diz respeito à introdução do predador generalista *Cryptolaemus montrouzieri* Muls. (Coleoptera: Coccinellidae) (Amaro, 1994b).

O tratamento biológico, feito através da libertação de inimigos naturais cujo efectivo populacional esteja reduzido no ecossistema, já foi efectuado em vários países incluindo Portugal, com a libertação inoculativa ou em massa do parasitóide *Leptomastix*



*dactylopii* How. (Hymenoptera: Encyrtidae) (Doutt, 1952; Krishnamoorthy & Singh, 1987; Tingle & Copland, 1989; Tranfaglia *et al.*, 1992).

Quanto à limitação natural, que consiste em manter as condições favoráveis à ocorrência dos inimigos naturais das pragas, conhece-se apenas o elenco das principais espécies de predadores e parasitóides da cochonilha-algodão em Portugal (Franco *et al.*, 1994), sendo necessário aprofundar o estado do conhecimento dos factores que regulam as populações destes inimigos naturais.

Apesar de experiências realizadas na década de 40 do século passado revelarem o papel fulcral de entomopatogéneos na regulação de populações de insectos como alternativa aos insecticidas químicos (Tanada, 1959), actualmente este grupo de inimigos naturais recebeu pouca ou nenhuma importância pela comunidade científica na luta biológica contra *Planococcus citri*.

### 1.5.2 – A LUTA BIOLÓGICA: OS ENTOMOPATOGÉNEOS

A entomopatologia é a ciência que estuda “tudo o que se passa de errado num insecto”, segundo a definição de Steinhilber (1949) - considerado o fundador da moderna patologia de insectos - sendo a base da luta microbiológica contra insectos (Figueiredo, 1997). Os entomopatogéneos, que incluem bactérias, vírus, fungos, nemátodes e protistas capazes de provocar doenças nos insectos (Lacey *et al.*, 2001) são, no seu conjunto, outro grupo interessante de inimigos naturais passíveis de serem usados na luta biológica contra *P. citri*.

Inúmeros entomopatogéneos podem ser produzidos em larga escala, formulados e aplicados às populações-praga de forma análoga aos insecticidas químicos (Chandler *et al.*, 2001), tal como vem sendo realizado desde 1938 com a bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner no controlo de várias espécies de Lepidoptera (Jacobs, 1951), mas actualmente os Microsporidia (ou Filo Microspora) revelam-se a maior promessa na luta biológica contra pragas (Chandler *et al.*, 2001).

## **Capítulo 2 – Os Microsporidia**

## 2.1- O Filo Microsporidia

Os Microsporidia (ou Filo Microspora), por agora considerados protozoários, constituem o grupo de parasitas menos estudados, apesar de estarem identificadas aproximadamente 1200 espécies (Magalhães *et al.*, 2006) distribuídas por cerca de 150 géneros (Wittner, 1999; Franzen, 2004) presentes em alguns grupos de invertebrados e em todas as cinco classes de vertebrados (Didier, 2005; Azevedo & Matos, 2002; Canning *et al.*, 2005). São eucariotas unicelulares, parasitas intracelulares obrigatórios e produtores de esporos (Keeling, 2002). Causam infecções crónicas nos hospedeiros o que provoca uma redução da sua “fitness” (Lewis *et al.*, 2006).

No conjunto dos eucariotas unicelulares, são os que revelam o maior potencial como agentes de luta biológica contra pragas agrícolas (Canning, 1982; Johny *et al.*, 2006). Considerando que cerca de metade dos géneros conhecidos de microsporídeos (69 em aproximadamente 150) têm insectos como hospedeiros (Becnel & Andreadis, 1999; Franzen, 2008), aprofundar o estudo da sistemática destes protistas e das interacções patogéneo-hospedeiro potenciará o sucesso de programas de luta biológica contra insectos-praga.

### 2.1.1 – SISTEMÁTICA, MORFOLOGIA E CICLO DE VIDA

Em 1857 Carl Wilhelm von Nägeli descreveu o organismo causador da doença do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.), designada pebrina (Wittner, 1999), como *Nosema bombycis* Nägeli, a primeira referência a um microsporídeo na literatura, que Nägeli descreveu como sendo uma levedura e colocou no Reino Fungi (Franzen, 2008).

Foram reconhecidos como Filo Microsporidia (Balbiani, 1882) (Sprague & Becnel, 1998), mas esta classificação não está isenta de controvérsia dado que também foram incluídos no Reino Protozoa por Goldfuss (1818) e no agora inexistente Reino Archeozoa por Haeckel (1894) (Vávra & Larsson, 1999), o que evidencia a intensa polémica gerada nos últimos dois séculos em torno da sistemática deste grupo singular (Cavalier-Smith, 1993).

Na última década, a hipótese deste grupo ser incluído no Reino Fungi tem ganho consistência, principalmente devido à introdução de dados moleculares na obtenção das relações filogenéticas (Cavalier-Smith, 1998; Badaulf *et al.*, 2000; Hirt *et al.*, 1999; Bruns, 2006; James *et al.*, 2006). Recentemente, um estudo abrangente sobre a

classificação do Reino Fungi inclui os Microsporidia num ramo basal deste reino, mas considera-os como um grupo-irmão dos restantes fungos e não como “verdadeiros fungos” (Hibbett *et al.*, 2007). Examinando a sua classificação ambígua e complexa, optou-se por incluir o Filo Microsporidia no Reino Protista (Franzen, 2008), apesar das fortes evidências da sua natureza fúngica.

Morfológicamente, são eucariotas verdadeiros, isto é, possuem um núcleo tipicamente eucariota, um sistema de membranas internas e citoesqueleto, mas revelam características moleculares e citológicas reminiscentes de procariotas (Méténier & Vivarès, 2001) que incluem o tamanho do genoma – à escala do das bactérias –, a ausência de mitocôndrias identificáveis, de peroxissomas, de hidrogenossomas e do típico aparelho de Golgi (Mathis *et al.*, 2005).

A característica mais diagnosticável de um microsporídeo é a sua célula infecciosa – o **esporo** – que é a única fase do ciclo de vida viável fora da célula hospedeira e mais facilmente reconhecível (Keeling & Fast, 2002). É uma célula única, cujas dimensões podem variar entre de 1-40 µm (Franzen & Müller, 1999). Relativamente à forma, esta também é variável podendo ser mais ou menos alongada (bastonete até redonda), mas a maioria é ovóide (Keeling & Fast, 2002).

O esporo é constituído por uma parede grossa que é composta por três camadas: o exósporo (camada externa eletronicamente densa e de composição proteica), o endósporo (camada interna eletronicamente luzente, e de composição quitinosa) e a membrana plasmática que envolve o citoplasma, o núcleo ou núcleos, vacúolo posterior e o aparelho infeccioso ou de extrusão (Bigliardi & Sacchi, 2001).

O **aparelho infeccioso** destes parasitas é a característica distintiva destes organismos, sendo composto por três organelos: o filamento polar – estrutura tubular enrolada em hélice ligada ao ápice do esporo através do disco ancorante –, o polaroplasto e o vacúolo posterior (Figura 3) (Vávra & Larsson, 1999). O número de voltas do filamento polar, o seu arranjo espacial relativo e o ângulo de inclinação da hélice permitem diagnosticar a espécie de microsporídeo (Keeling & Fast, 2002).

A extrusão deste filamento polar vai inocular o esporoplasma na célula hospedeira, sendo este o original mecanismo infeccioso dos microsporídeos (Franzen, 2004; Magalhães *et al.*, 2006). Com a entrada do esporoplasma do parasita na célula hospedeira, inicia-se a fase proliferativa do ciclo de vida, caracterizada pela ocorrência da **merogonia**, evento em que o parasita aumenta massivamente o seu número com a

formação de células designadas merontes. Segue-se a fase esporogénica que consiste na formação das células infecciosas – evento designado por **esporogonia** – que, ao germinarem reiniciam o ciclo (Bigliardi & Sacchi, 2001).

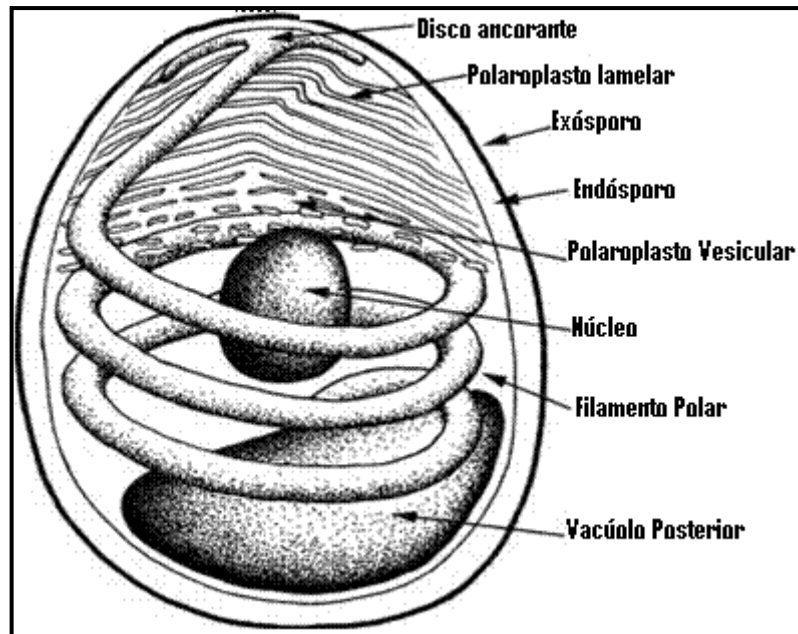


Figura 3: Constituição geral do esporo de Microsporidia (adaptado de Keeling & Fast, 2002).

### 2.1.2 – RELAÇÃO COM O HOSPEDEIRO

A maioria dos microsporídeos infecta todos os estados do desenvolvimento do hospedeiro, podendo causar a sua morte em poucos dias ou meses, variando a sua especificidade (desde o nível da espécie ao nível da classe) consoante a espécie em causa (Figueiredo, 1997).

De forma a completar o ciclo de vida, os microsporídeos têm de estar em contacto com o hospedeiro, penetrar no corpo do mesmo e reproduzir-se com sucesso nos tecidos adequados ao seu desenvolvimento e, conseqüentemente, contactar e infectar novos hospedeiros (Van Driesche & Bellows, 1996).

Uma vez que não procuram activamente o hospedeiro, os esporos destes patogéneos têm de estar presentes no ambiente do hospedeiro. Podem ser transportados pelo vento, água, outros organismos e, serem inoculados no hospedeiro por diversas vias, sendo a ingestão oral de esporos a forma mais comum (**transmissão horizontal**) (Figueiredo, 1997). Uma vez no interior do hospedeiro, ao reproduzir-se este pode transmiti-los à descendência (**transmissão vertical**). A transmissão vertical pode dar-se

transovariamente, ou seja, os patogêneos são transmitidos aos ovos aquando da postura, quando a fêmea já está infectada. Este tipo de transmissão é predominante nos microsporidia (Becnel & Andreadis, 1999).

O desenvolvimento do patogêneo pode ser potenciado por características inerentes ao hospedeiro, sendo uma das mais favoráveis o grau de contacto entre os hospedeiros. No caso das cochonilhas-algodão, a sua natureza gregária tem como consequência o estabelecimento de colónias em que se verifica a presença simultânea dos vários instares imaturos e de fêmeas adultas. Esta condição facilita não só a transmissão horizontal, pela morte de hospedeiros infectados ou ingestão de fezes, mas potencia bastante a vertical. A transmissão de microsporídeos é também bastante comum em colónias mantidas em estufas, devido às elevadas densidades populacionais dos insectos. Por esta razão, hipoteticamente, a preparação dum inóculo de microsporídeos de *Planococcus citri* em laboratório seria possível, dada a facilidade de manutenção destas populações em estufa (ver Capítulo 3), e este inóculo poderia ser posteriormente aplicado em pomares de citrinos de forma análoga a um insecticida químico.

## **2.2- A Luta Biológica com Microsporidia**

Quando se pretende levar a cabo a elaboração de um programa de luta biológica contra uma praga agrícola, existem preocupações de cariz ambiental que não podem ser negligenciadas. A questão principal é saber se os benefícios proporcionados pelo programa serão excedidos pelos custos ambientais decorrentes. Previamente à introdução de qualquer tipo de agente de luta biológica, é necessário avaliar intensivamente todas as componentes do ecossistema agrícola em questão e as interações entre elas e, particularmente, no que concerne à especificidade biológica do agente em relação ao hospedeiro.

### **2.2.1 – PROGRAMAS DE LUTA BIOLÓGICA**

Os Microsporidia estão envolvidos em 6 programas de controlo biológico de artrópodes (Hajek *et al.*, 2007). As referências a estes programas podem ser encontradas nas publicações da IOBC (*International Organization for Biological Control*). Esta organização, conjuntamente com a FAO (*Food and Agriculture Organization*),

estabelecem o código de conduta para importar ou libertar agentes de controlo biológico exóticos (FAO/IPPC, 1996).

Um caso de sucesso no estabelecimento e controlo a longo-prazo em culturas anuais ocorreu com a introdução de *Nosema pyrausta* (Paillot) (Microsporida: Nosematidae) contra a Broca-do-milho (*Ostrinia nubilalis* (Hübner)) (Lepidoptera: Crambidae) nos Estados Unidos da América (Lewis *et al.*, 2006). Durante o período de estudo de seis anos, verificou-se que *Nosema pyrausta* ocorre nas populações naturais da praga em todas as fases do seu ciclo de vida, e tem um impacto dramático na redução da fertilidade dos adultos e na sobrevivência das fases iniciais do desenvolvimento de *Ostrinia nubilalis*.

Outro caso reporta-se ao uso de *Nosema locustae* (Canning, 1857) no controlo de várias espécies de gafanhotos (Lacey & Goettel, 1995; Lacey *et al.*, 2001) na Argentina. Este microsporídeo foi introduzido várias vezes entre 1978 e 1982, estando bem estabelecido nas populações naturais e afectando cerca de 10 espécies de gafanhotos. Em 1980, a Agência de Protecção Ambiental (EPA) dos Estados Unidos da América registou *Nosema locustae* como o primeiro protozoário a ser produzido e comercializado como insecticida microbiológico (Lange & De Wysiecki, 1996).

### 2.2.2 – VANTAGENS E DESVANTAGENS DO USO DE MICROSPORIDIA NA LUTA BIOLÓGICA

Estão referenciadas inúmeras espécies de microsporídeos presentes em todas as ordens de insectos, por exemplo: Diptera (Becnel & Johnson, 2000; Micieli *et al.*, 2000; Andreadis & Vossbrinck, 2002), Orthoptera (Sokolova & Lange, 2002; Lange, 2003) Lepidoptera (Vávra *et al.*, 2006; Down *et al.*, 2004a), Coleoptera (Yaman & Radek, 2003), Hymenoptera (McIvor & Mallone, 1995; Higes *et al.*, 2006) e Odonata (Sokolova *et al.*, 2006).

Quanto à ordem Homoptera, foi descoberto *Nosema empoascae* na cigarrinha *Empoasca fabae* (Harris) (Homoptera: Auchenorrhyncha: Cicadellidae) e na sub-ordem Sternorrhyncha, na qual se inclui *Planococcus citri*, *Toxoglugea fanthami* (Weiser, 1961) no afídeo *Aphis rumicis* L. (Homoptera: Aphididae) (Ni *et al.*, 1995).

Relativamente ao impacto no hospedeiro, os microsporídeos causam geralmente uma doença crónica debilitante (microsporidiose) com resultados ao nível da perda de

vigor e no decréscimo da capacidade reprodutiva e longevidade (Becnel & Andreadis, 1999).

A transmissão dos microsporídeos ocorre por várias vias – ingestão de esporos presentes no meio ambiente, transmissão parental à descendência ou por transmissão sexual (Becnel & Andreadis, 1999; Knell & Webberley, 2004) - o que facilita a sua multiplicação na população-alvo.

São ubíquos factores naturais reguladores de populações de insectos (Henry, 1981), e a sua utilização em programas de luta biológica bem sucedidos é prova inegável da sua eficiência no combate às pragas agrícolas.

A cultura *in vivo* de microsporidia nos seus hospedeiros apresenta custos aceitáveis, dependendo principalmente do custo da manutenção laboratorial dos hospedeiros *per si* (Henry *et al.*, 1978).

Contudo, existem algumas limitações na aplicação destes patógenos em programas de luta biológica: não procuram activamente a espécie hospedeira como os insectos entomófagos (DeBach, 1974), são difíceis de reproduzir e manter em laboratório fora do corpo do hospedeiro (Gillott, 1980), não sendo uma alternativa economicamente sustentável.

Devido à sua baixa patogenicidade, actuam de forma lenta na morte do hospedeiro (Bell *et al.*, 2004), o que do ponto de vista dos agricultores, acostumados à rápida eficiência de actuação dos insecticidas convencionais (cuja aplicação geralmente causa um decréscimo abrupto e visível na densidade das pragas), a aplicação dum insecticida microbiológico que provoca a morte da praga de forma mais lenta e o seu controlo a longo-prazo nem sempre é encarada de forma favorável (Ekbom & Pickering, 1990).

Apesar de algumas espécies serem altamente específicas quanto ao hospedeiro, outras não o são (Lewis *et al.*, 2006; Down *et al.*, 2004a), pelo que as infecções de hospedeiros não-alvo são um risco que não pode ser rejeitado (Solter & Maddox, 1998).

Revelam características compatíveis com as desejadas para os insecticidas microbiológicos, mas as infecções crónicas (demasiado) lentas que provocam, em vez de agudas e rapidamente mortais (Solter & Maddox, 1998), e as dificuldades na produção em massa, torna-os difíceis de utilizar como insecticidas. No entanto, a sua utilização conjunta com outro tipo de insecticidas de origem química ou microbiológica revela um enorme potencial e tende a ser a mais bem sucedida (Dent, 1991).



## 2.3- Objectivos

Este estudo pretendeu aprofundar o estado do conhecimento sobre *Planococcus citri* (Homoptera: Pseudococcidae), praga-chave de citrinos em Portugal, e da sua interacção com inimigos naturais, particularmente entomopatogéneos pertencentes ao Filo Microsporidia, grupo nunca antes estudado neste insecto, mas com elevado potencial e já actualmente usado em programas de luta biológica contra outras pragas agrícolas.

## **Capítulo 3 – Metodologia**

A metodologia encontra-se dividida em diversas secções, que integram desde a fase de captura de *Planococcus citri*, a manutenção das colónias em estufa e sua posterior preparação para o estudo de esporos de microsporídeos em microscopia óptica e electrónica.

### 3.1- Captura de *Planococcus citri* no campo

A captura das cochonilhas-algodão (*Planococcus citri*) foi orientada de forma a obter indivíduos de regiões e explorações citrícolas distintas (quanto à área da exploração, espécies hospedeiras, regime de produção, áreas circundantes), factores que proporcionariam uma maior variabilidade à amostra.

A prospecção de insectos iniciou-se em Março de 2007 e prolongou-se até Maio de 2008, uma vez que a época propícia para encontrar esta espécie varia com a planta hospedeira, condições climáticas e inimigos naturais presentes (Carvalho, 1990; Franco *et al.*, 2004). Apesar de ser uma espécie polífaga (Guimarães, 1973; Cox & Bendov, 1986), a prospecção focou-se nos hospedeiros mais cultivados em Portugal: laranjeira-doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), limoeiro (*Citrus limon* (L.) Burm.) e tangerineira (*Citrus reticulata* Blanco) e onde a espécie se revela mais prejudicial (Silva, 2000; Franco *et al.*, 2004) (Figura 4).



Figura 4: Hospedeiros citrícolas de *Planococcus citri*. (Fotos: L. Góis)

### 3.1.1- PROSPECÇÃO DE *PLANOCOCCUS CITRI*

Existem mais de 20 espécies de cochonilhas (família Pseudococcidae) associadas aos citrinos da zona Mediterrânica (Viggiani, 1988) e devido ao elevado grau de semelhança entre elas, a sua identificação no campo suscita alguns problemas e muitos exemplares foram trazidos para laboratório onde foram identificados segundo Franco *et al.* 2000 (Anexo I).

Como *Planococcus citri* se concentra nos frutos em crescimento, procurou-se aí localizar as massas de aspecto algodinoso, resultantes dos aglomerados de indivíduos e dos sacos ovíferos (Franco & Carvalho, 1990). Outras evidências da sua presença são a excreção de melada (Figura 5, 1), que constitui um substrato nutritivo para alguns fungos saprófitos designados vulgarmente por fumagina (de aspecto negro, Figura 5, 2) (Silva, 2000), as descolorações e as deformações nas diversas estruturas da planta (Franco & Carvalho, 1990; Franco *et al.*, 2001).

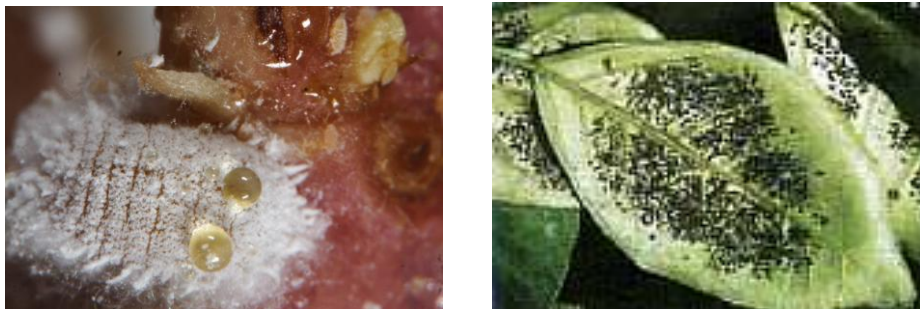


Figura 5: (1) Excreção de melada. (2) Fumagina. (Fotos: (1) E. Marabuto; (2) Anónimo)

Durante o período de estudo realizaram-se prospecções em diversos pomares de citrinos nos arredores de Lisboa, na Região Oeste e no Algarve, de forma a identificar populações de cochonilhas-algodão. Os locais de amostragem encontram-se assinalados no mapa (Figura 6).



Figura 6: Locais de amostragem. (1) Museu da Cidade (38°45'31.51"N e 9°9'23.76"O), (2) Gândara dos Olivais (39°46'31.47"N e 8°49'30.04"O), (3) Santa Iria de Azóia (38°50'20.54"N e 9°5'30.84"O), (4) DRAPALG, Patação (37°2'55.50"N e 7°56'59.66"O), (5) Centro de Experimentação Agrária de Tavira (37°7'15.17"N e 7°39'16.55"O), (6) Instituto Superior de Agronomia (38°42'26.05"N e 9°10'56.26"O), (7) Algoz (37°12'12.88"N e 8°18'21.57"O).

Inicialmente, foram colectados exemplares de *P. citri* em pomares de citrinos existentes nos seguintes locais: Museu da Cidade (Campo Grande, Lisboa), Gândara dos Olivais (Leiria), Santa Iria de Azóia (Loures), Centro de Experimentação Agrária de Tavira (CEAT, Tavira), Direcção Regional de Agricultura e Pescas do Algarve no Patação (DRAPALG, Faro), Algoz (Silves) e da população com origem em Silves e mantida em estufa no Instituto Superior de Agronomia (ISA, Lisboa). Conseguiu-se manter em estufa quatro destas populações (ver 3.2), as quais se designou por: “Silves”, “Tavira”, “Patação” e “Algoz”.

### 3.1.2- CARACTERIZAÇÃO DAS POPULAÇÕES DE *PLANOCOCCUS CITRI*

A população “Silves” foi obtida a partir de indivíduos pertencentes à população do insectário do Instituto Superior de Agronomia, com origem em colónias de *Planococcus citri* recolhidas em pomares de laranja-doce da região de Silves. Não há registo da variedade de laranja-doce nem das parcelas onde os insectos foram colectados. A população referida foi constituída em 2004 e desde então mantida em câmara climatizada, com temperatura de  $24,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , humidade relativa de  $52,0 \pm 0,5\%$  e ausência de fotoperíodo (com. pes. Campos, 2007).

A população “Tavira” teve origem em pomares de laranja-doce (variedade Navelina), que ocupam uma área de  $4000\text{m}^2$ , no Centro de Experimentação Agrária de Tavira (Conselho de Tavira). Dado que não foram avistadas fêmeas adultas de *P. citri*, colheram-se frutinhas em desenvolvimento, onde as ninfas se tendem a refugiar (com. pes. Franco, 2008), e que depois permitiram constituir a população.

A população “Patação” resultou da recolha de *Planococcus citri* nos pomares de citrinos da Direcção Regional de Agricultura e Pescas do Algarve no Patação (Braciais, Patação, Conselho de Faro), que ocupam uma área de  $6700\text{m}^2$  e onde estão reunidas cerca de 200 variedades de citrinos.

A população “Algoz” foi criada a partir de colónias de *Planococcus citri* recolhidas em pomares laranja-doce (variedade Newhall), com área de  $3000\text{m}^2$ , pertencentes ao produtor Afonso Vaz (Algoz, Conselho de Silves).

Uma vez colectados, os exemplares foram trazidos para o laboratório, onde foi confirmada a sua identificação e se pertencentes a *P. citri*, mantidos em estufa segundo o protocolo standard (ver 3.2).

### 3.2- Manutenção de populações de *Planococcus citri* em laboratório

A fim de se evitar a perda desnecessária de indivíduos capturados nos diferentes locais de amostragem e proporcionar a subsistência de populações viáveis ao longo de todo o período de estudo, a manutenção dos insectos em laboratório envolveu alguns cuidados.

Os insectos capturados foram mantidos em estufa no Laboratório do Departamento de Biologia Animal na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, em caixas de plástico contendo batatas geladas (*Solanum tuberosum* L.), a uma temperatura entre 22-24°C, sem fotoperíodo e com humidade relativa de 50%. A base das caixas foi coberta com papel absorvente substituído regularmente. A tampa das caixas foi recortada, e substituída por tecido poroso, de forma a favorecer a ventilação.

As batatas geladas constituem o substrato nutritivo ideal para estes insectos fitófagos, dada a facilidade de obtenção e equilíbrio energético proporcionado, sendo uma forma usual de manter populações de *P. citri* em estufa (Tingle & Copland, 1989). Apesar desta espécie se desenvolver em condições óptimas para valores de temperatura entre 27°C-33°C (fêmeas adultas) e 27°C-30°C (ninfas) (Franco *et al.*, 2000), o desenvolvimento à temperatura referida foi bastante aceitável. Optou-se por uma temperatura inferior à referida em bibliografia, pois a taxa de eclosão dos ovos diminuiu com o aumento da temperatura (Franco *et al.*, 2000). Segundo os mesmos autores, a humidade não constitui um factor demasiado significativo para o desenvolvimento, desde que a planta alimentícia não esteja em stress hídrico.

Considerando que a prospecção de microsporídeos em *Planococcus citri* se centra na fase adulta da fêmea, foi necessário completar o seu ciclo de vida (Figura 7), com a duração de 53 dias (Franco *et al.*, 2000), embora em condições laboratoriais este período possa ser mais variável.

À medida que as populações se foram estabelecendo, verificou-se sistematicamente o estado das mesmas, nomeadamente no que concerne à evolução do ciclo de vida, à eclosão de parasitóides, à substituição das batatas geladas e ao arejamento das caixas.



Figura 7: Ciclo de vida de *Planococcus citri*. (1) Sacos ovígeros. (2) Fêmeas de 1º instar. (3) Fêmeas de 2º e 3º instares. (4) Fêmea adulta. (Fotos: E. Marabuto)

### 3.3- Prospecção de microsporídeos em *Planococcus citri*

O protocolo experimental associado à detecção de Microsporídeos em fêmeas adultas de *Planococcus citri* envolveu as seguintes técnicas de microscopia electrónica: microscopia de transmissão (TEM: *Transmission Electron Microscopy*) e de varrimento (SEM: *Scanning Electron Microscopy*).

Para ambas as técnicas seguiu-se um protocolo standard, mas que foi adaptado quer aos parasitas que se pretendiam encontrar, quer aos insectos em questão segundo a consulta de diversas fontes (Salema & Santos, 1992; Figueiredo *et al.*, 2001; com. pes., Azevedo, 2007; Graham & Orenstein, 2007), pelo que foi necessário efectuar estudos *a priori* que levaram à introdução de etapas específicas e inéditas neste protocolo.



### 3.3.1- PREPARAÇÃO DE PLANOCOCCUS CITRI PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Numa primeira etapa, foram seleccionadas 40 fêmeas adultas das populações “Silves”, “Tavira”, “Patação” e 42 da população “Algoz”, que foram colocadas em frascos de vidro devidamente identificados (Figura 8). Seguidamente, procedeu-se à eliminação da cobertura cerosa das cochonilhas – pois esta revelou afectar o seu manuseamento, sendo prejudicial às etapas consequentes – submergindo e mantendo os insectos por cerca de 12 horas em 10 ml de xilol, hidrocarboneto aromático que dissolve as ceras e permite a conservação dos insectos (Franco *et al.* 2000; Downie & Gullan, 2004). Para determinar o tempo de permanência em xilol, foi desenvolvido um estudo preliminar, no qual se constatou que as 12 horas representam um intervalo de tempo adequado.

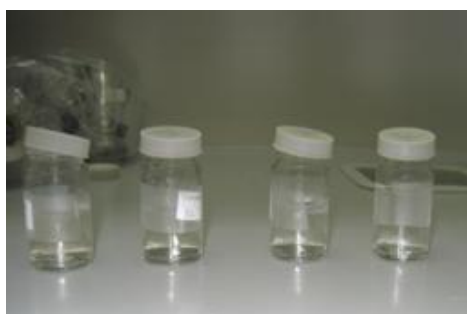


Figura 8: Amostras das quatro populações em estudo. (Foto: L. Góis)

### 3.3.2- COLHEITA E FIXAÇÃO DOS TECIDOS

A colheita dos tecidos para observação em microscopia electrónica é uma fase extremamente crucial, devendo ser realizada o mais rapidamente possível, para que não ocorra actividade enzimática que destruirá parte das estruturas a observar (Salema & Santos, 1992; Graham & Orenstein, 2007). Os microsporídeos tendem a concentrar-se nas gónadas, no tecido adiposo e no tubo digestivo (Becnel & Andreadis, 1999; Lobo *et al.*, 2006), mas dada a reduzida dimensão das fêmeas de *Planococcus citri*, a colheita focou-se na recolha do tubo digestivo.

Em caixas de Petri, extraiu-se individualmente o tubo digestivo de cada indivíduo, removido a partir do ânus dos insectos, processo que decorreu conjuntamente com a

pré-fixação (1ª fixação ou fixação primária), durante a qual se substituíram os conteúdos celulares por um fixador. O fixador utilizado foi o glutaraldeído ( $C_5H_8O_2$ ) a 2,5% (v/v) (Canning *et al.*, 2005), tamponado em cacodilato de sódio ( $C_2H_6AsNaO_2 \cdot 3H_2O$ ) a 0,1 M (w/v) e pH 7,2 (Canning *et al.*, 2001). Comercialmente, quer o glutaraldeído quer o tampão cacodilato de sódio não vêm nas condições desejadas, pelo que se descreve em anexo o modo de preparação e os cuidados de manuseamento (Anexo II).

A **pré-fixação** foi efectuada colocando-se uma gota de glutaraldeído sobre uma caixa de Petri na qual se colheu e macerou o tubo digestivo (para libertação de esporos), para que estes fossem imediatamente penetrados pelo fixador. Apesar de alguns autores realizarem esta etapa à temperatura ambiente de 18-20°C (Salema & Santos, 1992) esta foi realizada a 4°C, temperatura que anula a actividade de enzimas hidrolíticas, evitando-se assim a lise das células (Figueiredo *et al.*, 2001; Azevedo & Matos, 2002). A caixa de Petri foi colocada num recipiente com gelo, bem como o frasco do fixador, e concretizou-se a colheita o mais rapidamente possível. Uma vez extraído o tubo digestivo, este foi colocado num recipiente devidamente identificado com o nome da população (ver 3.1) com 2ml de glutaraldeído.

Para eliminar quaisquer resquícios de outros tecidos e particularmente de partículas cerosas, verificou-se *a priori* a obtenção de amostras mais límpidas realizando a centrifugação das mesmas. A centrifugação foi realizada durante 30 minutos a 20°C (8430 rpm) (Azevedo, com. pes. 2008), numa centrífuga Beckman J2-21M/E. Uma vez concluída esta etapa, os tubos de centrífuga foram posicionados no recipiente com gelo e removeu-se o sobrenadante para frascos com 2ml de fixador, que foram colocados no frigorífico.

O tempo de fixação para esporos de microsporídeos é bastante variável consoante a espécie, método de fixação e fixador utilizados, mas está compreendido entre as 20 e 24h, pois a parede destas células é hermeticamente fechada e densa, o que dificulta a fixação dos tecidos. No caso das cochonilhas-algodão, desconhecendo-se qual a(s) espécie(s) implicada(s), optou-se por um tempo de fixação de 24 horas (Ni *et al.*, 1995; Larsson, 2005; com. pes. Azevedo, 2007), período durante o qual se foi agitando regularmente as amostras.

Posteriormente, fez-se uma lavagem com aproximadamente 10ml de tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2), para remover o excesso de fixador que não reagiu

(Figueiredo *et al.*, 2001). Previamente à colocação do tampão, o sobrenadante foi aspirado, tendo sido colocado num recipiente próprio para incineração. Nesta fase, deve-se atentar para a não remoção do material biológico ou a totalidade do glutaraldeído. Finalmente agitaram-se as amostras, recolocando-as no frigorífico, onde permaneceram durante o mesmo tempo da pré-fixação (24 horas).

Na etapa seguinte designada **pós-fixação** (2ª fixação ou fixação secundária), utilizou-se um fixador secundário, para estabilizar os conteúdos celulares, uma vez que o glutaraldeído tendencialmente causa a contracção dos mesmos (Salema & Santos, 1992). Como pós-fixador recorreu-se ao tetróxido de ósmio ( $\text{OsO}_4$ ) em solução aquosa a 2% (w/v), cuja preparação vem descrita em anexo (Anexo II). Os vapores do tetróxido de ósmio são tóxicos, pelo que esta etapa foi realizada na Hotte (Graham & Orenstein, 2007) (Figura 9). Por ser reduzido pela luz solar, este reagente deve ser guardado em frascos escuros, envoltos em papel de alumínio e bem rolhados. Com uma pipeta removeu-se o tampão cacodilato de sódio e adicionou-se cerca de 2ml de tetróxido de ósmio a cada amostra, que permaneceu no frigorífico durante 3 horas.



Figura 9: Pós-fixação com tetróxido de ósmio. (Foto: L. Campos)

### 3.3.3- DESIDRATAÇÃO

A **desidratação** consistiu na adição sucessiva de etanol em várias concentrações, totalmente realizada à temperatura ambiente, para substituir a água do material biológico (Salema & Santos, 1992; Figueiredo *et al.*, 2001), pois se este estiver hidratado sofre alterações aquando da observação em microscopia electrónica.

Primeiramente, removeu-se o tetróxido de ósmio, sempre com a especial atenção em manter o material biológico nos frascos e foi-se adicionando 4 ml de etanol a cada amostra, numa série ascendente de concentrações. Tratando-se de um estudo de microsporídeos, os períodos de permanência no etanol são extremamente variáveis consoante as espécies (Undeen, 1997; Rebelo, 2000; Schottelius *et al.*, 2000), pelo que se optou por um período de 10 horas em cada concentração. Assim, utilizou-se etanol a 50%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95% e 100% (etanol puro ou álcool pró-análise) (Figura 10). No final, as amostras estiveram em álcool a 100% por três vezes a fim de maximizar a desidratação. O etanol a 95% foi preparado a partir do etanol puro (pró-análise) e as restantes soluções a partir de álcool etílico comercial a 96%.



Figura 10: Desidratação com série ascendente de etanol a 7 concentrações. (Foto: L. Góis)

Posteriormente à desidratação com etanol, cada amostra foi dividida em duas partes, que foram submetidas a diferentes procedimentos consoante o tipo de microscopia a que se destinavam: Microscopia Electrónica de Transmissão (ver 3.3.4 a 3.3.6) e Microscopia Electrónica de Varrimento (ver 3.4).

### 3.3.4- IMPREGNAÇÃO

Antes de se iniciar a impregnação, etapa que culmina com a formação de blocos de resina contendo as amostras para visualização em microscopia electrónica de transmissão (ver 3.3.4), utilizou-se um solvente intermediário compatível com a resina escolhida. O solvente de transição escolhido foi o óxido de propileno ( $C_3H_6O$ ), líquido tóxico e altamente volátil que tem de ser manuseado na Hotte, e ao utilizá-lo pretendeu-se remover alguns restos de água que tenham permanecido no interior dos tecidos

(Salema & Santos, 1992). Removeu-se de cada amostra o álcool a 100% e adicionou-se cerca de 2ml de óxido de propileno, permanecendo as amostras cerca de 10 horas à temperatura ambiente. Repetiu-se o último passo, com o mesmo volume de óxido de propileno e durante o mesmo período de tempo.

A **impregnação** consiste na substituição do agente desidratante pelo meio de inclusão que ao penetrar nos tecidos endurece, constituindo uma peça plástica com resistência suficiente para ser seccionada e observada em microscopia de transmissão (Figueiredo *et al.*, 2001). O meio de inclusão seleccionado foi o Epon 812, produto resinoso pertencente ao grupo das resinas epóxicas, que constituem o grupo de meios de inclusão mais utilizados dada a facilidade de manuseamento e baixa toxicidade (Graham & Orenstein, 2007).

A impregnação foi realizada misturando óxido de propileno e Epon 812, ocorrendo por etapas em que se foi aumentando sucessivamente a quantidade de Epon 812. O Epon polimeriza a altas temperaturas (60°C) tornando-se duro – constituindo o meio de inclusão do material biológico – mas enquanto se procede às etapas da impregnação e inclusão, deve ser guardado no frigorífico ( $\pm 20^{\circ}\text{C}$ ). A preparação de Epon 812 vem descrita em anexo (Anexo II).

As etapas da impregnação foram executadas adicionando às amostras óxido de propileno e Epon 812 nas proporções de 3:1, 1:1 e 1:3, tendo cada etapa a duração de 20 horas. A duração de cada etapa é variável consoante o material a incluir e a resina a que se recorre. A etapa final da impregnação consiste na adição de Epon 812 ao qual se adicionou o polimerizador DMP-30 (2,4,6-tridimetil-aminometil fenol), permanecendo as amostras nesta mistura durante 4 horas.

### 3.3.5- INCLUSÃO

Previamente à inclusão, escreveu-se a lápis em etiquetas de papel vegetal, a identificação de cada amostra (letra identificativa da população, número da amostra, ano). Utilizaram-se moldes maleáveis de silicone (LADD ©) com vários poços de capacidade individual de aproximadamente 0,2ml. (Figura 11, 1), que foram lavados várias vezes com álcool a 96% e secos em estufa a 60°C, para total eliminação da matéria orgânica. No final da impregnação, verteu-se o conteúdo de cada frasco para um papel de filtro.

Utilizando uma seringa, colocou-se uma gota de Epon 812 (solução final com o polimerizador) na base do molde e, com uma agulha (Figura 11, 2), posicionou-se o material biológico junto à parede do poço e preencheu-se com Epon 812 até ficar “abaulado”.

Os moldes foram colocados na estufa durante 3 dias a 60°C, para que ocorresse a polimerização, ficando as cápsulas rígidas. Depois de solidificadas, removeram-se os excessos de plástico das cápsulas que foram guardadas em caixas devidamente identificadas.

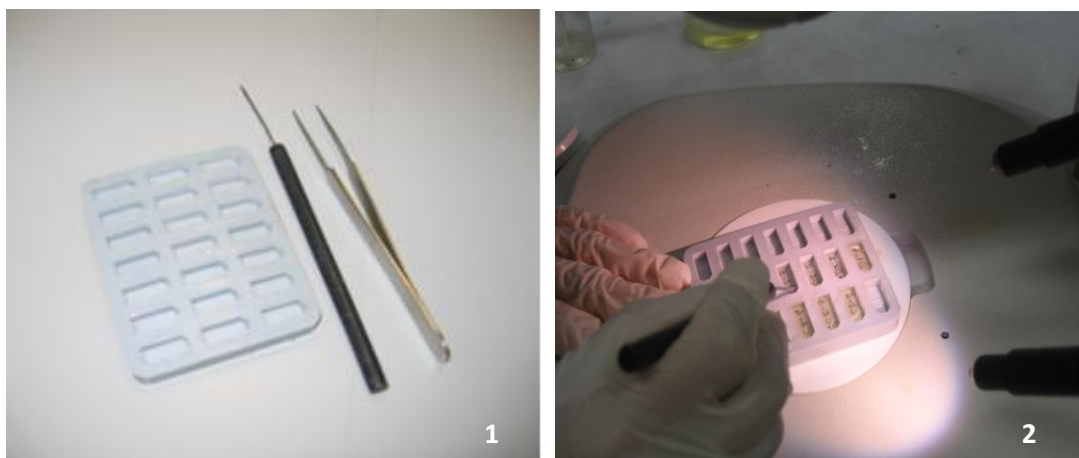


Figura 11: (1) Moldes para cápsulas de Epon. (2) Formação de cápsulas de Epon. (Fotos: L. Góis)

### 3.3.6- ULTRAMICROTOMIA (SECCIONAMENTO) E CONTRASTAÇÃO

A **ultramicrotomia** é uma técnica que recorre a um ultramicrotomo para cortar secções finas ou ultra-finas dos blocos de Epon anteriormente formados, recorrendo a facas de vidro ou de diamante, consoante a espessura desejada dos cortes (Salema & Santos, 1992). O ultramicrotomo é um instrumento extremamente sensível a trepidações, vibrações e correntes de ar, sendo a técnica de corte de difícil execução e que requer alguma prática. Ao longo do período de estudo houve a possibilidade de manuseamento e treino num ultramicrotomo LKB 2128 (Figura 12) existente na Estação Agronómica Nacional (Oeiras), mas considerando-se o seccionamento dos blocos uma

etapa vital e exigente do protocolo, optou-se por recorrer aos serviços da técnica Marisa Pardal da Unidade de Histologia do Instituto Gulbenkian para a Ciência (IGC) em Oeiras.



Figura 12: Ultramicrotomo LKB 2128 da Estação Agronómica Nacional. (Foto: L. Góis)

Realizaram-se cortes semi-finos (espessura  $\approx 1\mu\text{m}$ ) para serem observados em microscopia de luz (ver 3.4). Estes foram corados com azul de toluidina (Canning *et al.*, 2005) a 1% em 1/10 de carbonato de sódio a 3%, montados em lâminas de vidro e posteriormente observados num microscópio óptico Olympus DP50 na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

Foram efectuadas séries de cortes ultra-finos (espessura  $\approx 50\text{nm}$ ), designadas “ténias de cortes”, destinadas à microscopia electrónica de transmissão. Sendo o material biológico constituído principalmente por moléculas contendo Carbono, Hidrogénio, Oxigénio e Azoto, elementos químicos de baixa massa atómica que surgem transparentes ao serem atravessados pelo feixe de electrões dum microscópio electrónico de transmissão, recorre-se a contrastantes que aumentam o poder de dispersão dos electrões. Na contrastação utilizaram-se o acetato de uranilo a 5% em metanol e o citrato de chumbo a 0,4%. Posteriormente, os cortes foram montados em grelhas de cobre (150 mesh) com membrana *formvar*, guardadas em suportes para grelhas. Observou-se os cortes ultra-finos no microscópio electrónico de transmissão JEOL JEM-100CX da Unidade de Imagiologia Celular do IGC em Oeiras.

### 3.4- Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM)

No microscópio electrónico de varrimento o feixe de electrões não atravessa a amostra mas, ao interagir com esta, provoca a emissão de electrões da sua superfície e possibilita a sua projecção num monitor, no qual cada ponto do espécime corresponde a uma região da imagem observada (Figueiredo *et al.*, 2001). Tendo o material biológico sido preparado segundo o protocolo descrito anteriormente (secções 3.3.1 a 3.3.3) direccionado para a preservação da sua estrutura, a visualização neste tipo de microscópio pressupõe novas etapas. Depois de desidratadas (ver 3.3.3), as amostras foram filtradas por um sistema de filtração *Swinnex* MILLIPORE® (diâmetro = 13mm) ligado a uma seringa (Figura 13, 1). Ao pressionar o êmbolo, fez-se passar cada amostra por um filtro ISOPORE® (diâmetro dos poros = 3,0 µm) (Figura 13, 2). O objectivo desta etapa nova é o de não possibilitar que as amostras entrem em contacto com o ar, o que poderia provocar o colapso das estruturas celulares, impossibilitando a sua observação em três dimensões em SEM.

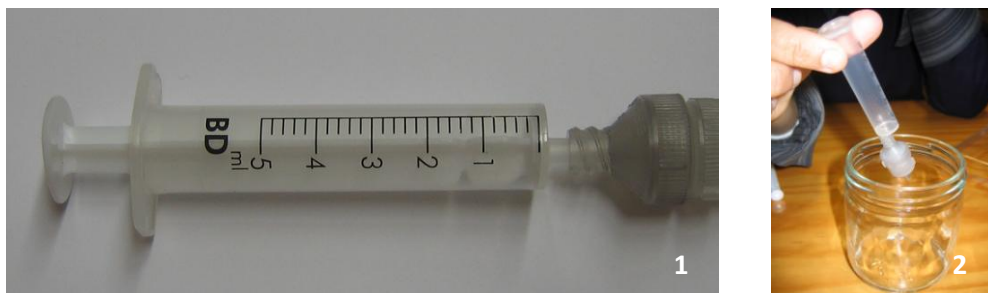


Figura 13: (1) Sistema de filtração Swinnex ligado a uma seringa. (2) Filtração das amostras através do filtro no interior do sistema de filtração. (Fotos: L. Góis)

Os filtros foram rapidamente removidos e colados em suportes especiais para SEM (*stubs*) previamente revestidos com fita-cola dupla de carbono com propriedades condutoras (Figura 14, 1). As amostras seguiram para uma etapa crucial em SEM, a metalização, onde é depositada uma fina camada de ouro sobre os espécimes num aparelho designado metalizador JFC-1200 (Figura 14, 2) durante 20 minutos.





Figura 14: (1) Filtros colados em stubs para SEM. (2) Metalizador JFC-1200. (Fotos: L. Góis)

As preparações obtidas foram observadas no microscópio electrónico de varrimento JEOL JSM-5200 LV (Figura 15) na Unidade de Microscopia de Varrimento da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.



Figura 15: Microscópio Electrónico de Varrimento JEOL JSM-5200 LV. (Foto: L. Góis)

## **Capítulo 4 – Resultados e Discussão**

#### 4.1- Captura de *Planococcus citri* e manutenção das populações em laboratório

A prospecção de cochonilhas-algodão em plantações de citrinos decorreu entre Março de 2007 e Maio de 2008, embora a época de risco para a ocorrência desta espécie esteja compreendida entre Maio e Junho, altura em que as ninfas do segundo instar migram do tronco e ramos das árvores e se instalam no cálice dos frutos jovens (Frescata, 2004), uma migração sintonizada com a fenologia do hospedeiro. No Inverno é mais difícil detectar exemplares de *P. citri*, uma vez que a sua densidade populacional nesta altura do ano é geralmente baixa (Franco *et al.*, 2000). Contudo, para efeitos de amostragem, optou-se por um período de prospecção mais alargado, tendo-se realizado idas regulares ao campo, embora em inúmeras ocasiões não se tenham detectado colónias de *Planococcus citri*.

A prioridade principal durante o período de amostragem foi garantir a obtenção de *Planococcus citri* em pomares de citrinos com características distintas, de forma a incrementar a diversidade dos indivíduos obtidos, havendo assim, teoricamente, uma maior possibilidade destes estarem infectados com microsporídeos. Por este motivo, escolheram-se locais de amostragem que diferiam em inúmeros aspectos. É de salientar as diferenças na área de cultivo dos locais de amostragem (p.e.: de apenas algumas árvores no pomar de citrinos do Museu da Cidade de Lisboa a uma área de plantação de 6700m<sup>2</sup> na Direcção Regional de Agricultura e Pescas do Algarve, Patacão) e nos hospedeiros plantados nos diversos locais (p.e.: apenas laranjeira-doce em Tavira e mais de 200 variedades de citrinos no Patacão).

Uma vez colectados os exemplares, estes foram levados para a estufa e mantidos segundo as condições referidas no Capítulo 3. A manutenção de populações de *Planococcus citri* em condições laboratoriais exige alguns cuidados, tais como o arejamento das caixas, substituição periódica do hospedeiro provisório – neste caso, de batatas grelhadas – e do papel de filtro do fundo das caixas devido à excreção de melada.

Não foi possível a manutenção das populações provenientes do Museu da Cidade de Lisboa, Gândara dos Olivais e Santa Iria de Azóia, provavelmente devido ao número de exemplares colectado nestes locais, que sempre evidenciaram baixas densidades populacionais quando amostrados (<10 indivíduos por período de amostragem). Estas baixas densidades podem resultar de flutuações populacionais, mas a razão mais

provável será possivelmente a reduzida dimensão destes pomares, no geral com menos de 50 árvores.

Relativamente às populações efectivamente mantidas em estufa – “Silves”, “Tavira”, “Patação” e “Algoz” – ao longo do período de estudo foi possível registar todo o ciclo de vida de *Planococcus citri*, verificando-se em todos os casos a sobreposição das várias gerações. Isto deve-se à forma como se realiza a manutenção laboratorial das populações: aquando da altura das posturas, remove-se uma porção das mesmas com o auxílio de uma agulha e coloca-se num novo hospedeiro provisório. Como nem todas as fêmeas realizam a postura simultaneamente e nem todos os ovos removidos estão na mesma altura do desenvolvimento, ocorre um escalonamento das posturas, o que se traduz na obtenção de populações com insectos nos vários estados de desenvolvimento.

No geral, as populações utilizadas neste estudo desenvolveram-se favoravelmente, atingindo densidades bastante elevadas (>200 indivíduos/população/geração). Contudo, registou-se a eclosão singular numa das populações de *Anagyrus pseudococci* (Girault) (Hymenoptera: Encyrtidae) (Islam *et al.*, 1997) (Figura 16), um endoparasitóide de *Planococcus citri*, embora se desconheça a população em causa, dado que o parasitóide foi encontrado no exterior das caixas. Esta eclosão exemplifica como este parasitóide, usado em programas de luta biológica contra esta praga, está extremamente bem adaptado ao hospedeiro, eclodindo mesmo em condições distintas das naturais.



Figura 16: Macho de *Anagyrus pseudococci* (Girault) (Hymenoptera: Encyrtidae), endoparasitóide de *Planococcus citri* (Risso) (Homoptera: Pseudococcidae). (Foto: E. Marabuto)

## 4.2- Prospecção de microsporídeos em *Planococcus citri*

Apesar de *Planococcus citri* ser considerada praga-chave na citricultura, de ter uma ocorrência cosmopolita a nível global (Ben-Dov, 1994), a nível regional na Bacia mediterrânica e em Portugal (Carvalho, 1994), e do conhecimento dum grande número dos seus inimigos naturais estar bastante desenvolvido (Franco *et al.*, 2006), a pesquisa de microsporídeos em *Planococcus citri* nunca tinha sido anteriormente realizada, menosprezando o papel fundamental dos Microsporidia na regulação das populações de insectos-praga (Henry, 1981). Consequentemente, não existe uma metodologia adaptada ao hospedeiro e a este grupo de patogéneos, tendo sido necessário consultar diferentes fontes bibliográficas (livros, artigos publicados em revistas da especialidade, sítios na Internet) e condensar a informação obtida num protocolo metodológico experimental inédito na sua essência, dada a inexistência de fontes de informação mais específicas para o modelo em causa.

Consequentemente, a metodologia deste trabalho resultou num esforço de compilação de inúmeros protocolos laboratoriais standardizados (p.e.: Salema & Santos, 1992; Tonka & Weiser, 2000; Andreadis & Vossbrinck, 2002; Graham & Orenstein, 2007), combinados com: estudos *a priori* nas etapas que suscitaram mais dúvidas (p.e., remoção das cobertura cerosa da cochonilha-algodão sem danificar os restantes tecidos), frequência do Curso de Microscopia Electrónica de Transmissão na Universidade de Trás-os-Montes e Alto-Douro (UTAD) e senso-comum.

Em todas as etapas da metodologia foi necessário optar entre variadíssimos reagentes (fixadores, pós-fixadores, agentes desidratantes, solventes intermediários, materiais de inclusão, contrastantes), desconhecendo-se ao longo da realização do protocolo as consequências destas escolhas nos resultados pretendidos, i.e., na detecção de microsporídeos em *P. citri*.

Foram dissecadas 162 fêmeas adultas de *Planococcus citri*, aproximadamente 40 de cada população, às quais se removeu o tubo digestivo. Considerando a dimensão reduzida destes insectos - as fêmeas adultas têm entre 1,6-3,5mm de comprimento (Kosztarab, 1996) - esta foi a etapa do protocolo que exigiu mais treino, e previamente à realização do protocolo laboratorial foram realizadas inúmeras extracções do tubo digestivo em fêmeas provenientes da população “Silves”.

A observação das lâminas com cortes semi-finos (espessura  $\approx 1\mu\text{m}$ ) preparados para microscopia óptica, das séries de cortes ultra-finos (espessura  $\approx 50\text{nm}$ ) no microscópio electrónico de transmissão e das amostras preparadas segundo o protocolo de TEM no microscópio electrónico de varrimento **não revelaram a presença de microsporídeos em *Planococcus citri***. Estes resultados não estão de acordo com os esperados e não permitem concretizar alguns dos objectivos deste trabalho, ou seja, a identificação de espécies (novas ou anteriormente descritas) de microsporídeos no hospedeiro *P. citri*, à semelhança do que se verificou noutras espécies de Homoptera (Ni *et al.*, 1995).

Contudo, ao não se ter verificado a ocorrência destes entomopatogéneos, extremamente abundantes em insectos das mais variadas ordens (Becnel & Andreadis, 1999), não permite rejeitar a hipótese de que não existem espécies do Filo Microsporidia em cochonilhas-algodão. Especulando-se sobre as razões na base da inexistência verificada nos insectos em questão, podem-se referir inúmeros factores:

- A intensificação do esforço de amostragem poderia ter possibilitado obter um maior número de populações de *Planococcus citri* com diferentes origens, o que por sua vez potenciaria uma maior variabilidade intra-populacional, uma vez que a natureza sedentária das fêmeas de cochonilha-algodão – que permanecem no mesmo hospedeiro durante todo o ciclo de vida – e a sua reduzida capacidade de dispersão originam um baixo fluxo genético inter-populacional (Franco *et al.*, 2000), apenas garantido pela mobilidade dos machos durante o seu curto período de voo (Silva, 1997).
- A maximização da heterogeneidade das amostras seria conseguida ao colectar-se o maior número de exemplares de *Planococcus citri* em diferentes hospedeiros citrícolas, locais e alturas de colecta, bem como nos mesmos locais em ocasiões distintas. O número de insectos utilizado neste estudo garante uma amostra com significância estatística, mas os resultados poderiam ter sido diferentes se este tivesse sido superior, o que garantiria uma maior robustez de amostragem.
- Outra hipótese que possibilita explicar a ausência de microsporidia nos insectos estudados poderá estar relacionada com a quantidade de esporos presentes no hospedeiro que, se for em baixas concentrações, dificilmente será detectado num protocolo de microscopia electrónica (Yaman & Radek, 2003). A maioria dos estudos de prospecção de esporos de microsporidia em insectos prevê *a priori* que as populações em estudo estejam efectivamente infectadas ou que existam

estudos preliminares em grupos taxonómicos próximos (Género, Família, Superfamília), duas circunstâncias inexistentes neste caso.

- Um outro factor poderá estar na base dos resultados obtidos está relacionado com a realização do protocolo de microscopia electrónica de transmissão. Trata-se de um protocolo extenso, de difícil execução em algumas das suas etapas e particularmente dispendioso (custos dos reagentes, material de laboratório e sessões de microscopia), o que só permitiu que fosse realizado uma única vez. A possibilidade da sua repetição, que motivos cronológicos e orçamentais não permitiram, seria talvez o factor que mais contribuiria para resultados mais satisfatórios, visto a TEM (*Transmission Electron Microscopy*) ser uma excelente técnica de diagnose de microsporídeos e que permite a sua melhor caracterização morfológica (Méténier & Vivarès, 2001).

Ao não se detectar espécies de microsporídeos em cochonilhas-algodão, esta dissertação dá particular ênfase à descrição das técnicas metodológicas utilizadas e à elaboração dum protocolo metodológico inédito. Espera-se num futuro próximo que o aperfeiçoamento e a comprovação da eficácia deste protocolo contribuam para a detecção de Microsporidia em *Planococcus citri* ou outros pseudococcídeos, na sua globalidade importantes pragas de citrinos (Silva, 1997).

## Considerações finais

Com este trabalho pretendeu-se aprofundar o estado do conhecimento sobre as componentes dos ecossistemas agrícolas, particularmente ao nível dos factores responsáveis pela dinâmica populacional de insectos nocivos, procurando dar um passo fundamental no seu controlo.

Aqui, os entomopatogéneos em geral e os Microsporidia em particular, constituem um grupo de inimigos naturais eficazes no controlo das populações-praga, algo comprovado em inúmeros programas de luta biológica mas nunca anteriormente constatado como actuante sobre *Planococcus citri*, importante praga-chave de citrinos.

Na óptica de otimizar a limitação natural de *Planococcus citri* procurou-se, sem sucesso, detectar nesta espécie a presença de Microsporidia, e assim contribuir de forma fulcral para o controlo desta cochonilha em meio agrícola.

Contudo, este trabalho mostrou-se basal como ponto de partida para futuros estudos sobre a temática do controlo microbiológico com Microsporidia, e na optimização da detecção destes entomopatogéneos na cochonilha-algodão e noutros insectos análogos.



## Referências Bibliográficas

- Agustí, M. (2000) *Citricultura*. Ediciones Mundi-Prensa. 416pp.
- Amaro, P. & Baggiolini, M. (1982) *Introdução à Protecção Integrada. Volume I*. Lisboa FAO/DGPPA.
- Amaro, P. (1994a) As pragas, doenças e infestantes de citrinos e o seu combate em Portugal. In: *Cong Citric Silves*. Silves. pp.145-160.
- Amaro, P. (1994b) A evolução dos meios de luta contra os inimigos dos citrinos em Portugal. In: *Cong Citric Silves*. Silves. pp.361-377.
- Andreadis, T.G. & Vossbrinck, C.R. (2002) Life Cycle, Ultrastructure and Molecular Phylogeny of *Hyalinocysta chapmani* (Microsporidia: Thelohaniidae), a parasite of *Culiseta melanura* (Diptera: Culicidae) and *Orthocyclops modestus* (Copepoda: Cyclopidae). *J Eukaryot Microbiol* **49**(4), 350-364.
- Arnett, R.H. (1993) *American Insects. A handbook of the insects of America north of Mexico*. Sandhill Press. Gainesville, FL.
- Argov, Y., Rössler, Y., Voet, H. & Rosen, D. (2003) The biology and phenology of the citrus whitefly, *Dialeurodes citri*, on citrus in the Coastal Plain of Israel. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **93**, 21-27.
- Aubert, B. (1994) Uma estratégia mediterrânica de produção de material citrícola de elite isento de doenças de degenerescência, uma vantagem para Portugal. In: *Cong Citric Silves*. Silves. pp. 61-71.
- Azevedo, C. & Matos, E. (2002) Fine structure of a new species, *Loma myrophis* (Phylum Microsporidia), parasite of the Amazonian fish *Myrophis platyrhynchus* (Teleostei, Ophichthidae). *Europ J Protistol* **37**, 445-452.
- Baldauf, S.L. *et al.* (2000) A Kingdom-Level Phylogeny of Eukaryotes Based on Combined Protein Data. *Science* **290**, 972-976.
- Ben-Dov, Y. (1994). *A systematic catalogue of the mealybugs of the world (Insecta: Homoptera: Coccoidea: Pseudococcidae and Putoidea), with data on geographical distribution, host plants, biology and economic importance*. Andover. Intercept.
- Becnel, J.J. & Andreadis, T.G. (1999) Microsporidia in insects. In: *The Microsporidia and Microsporidiosis*. Wittner, M. (ed.). Washington, D.C. American Society for Microbiology. pp.447-539.
- Becnel, J.J. & Johnson, M.A. (2000) Impact of *Edhazardia aedis* (Microsporidia: Culicosporidae) on a Seminatural Population of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Biological Control* **18**, 39-48.

- Bell, H.A., Down, R.E., Kirkbride-Smith, A.E. & Edwards, J.P. (2004) Effect of microsporidian infection in *Lacanobia oleracea* (Lep., Noctuidae) on prey selection and consumption by the spined soldier bug *Podisus maculiventris* (Het., Pentatomidae). *JEN* **128**(8), 548–553.
- Berberan, J.C. (1949) *Contribuição para o estudo da sistemática, morfologia, biologia e ecologia do Pseudococcus citri* Risso, em Portugal. Relatório Final do Curso de Engenheiro-Agrônomo. Universidade Técnica de Lisboa. Instituto Superior de Agronomia. 167pp.
- Bigliardi, E. & Sacchi, L. (2001) Cell biology and invasion of the microsporidia. *Microbes and Infection* **3**, 373-379.
- Bravo, A. & Soberón, M. (2008) How to cope with insect resistance to Bt toxins? *Trends in Biotechnology* **26**(10).
- Brent, K.J. (1987) Fungicide resistance in crops - its practical significance and management. In: *Biological Control*. Chapman & Hall. 539pp.
- Bruns, T. (2006) A kingdom revised. *Nature* **443**, 758-760.
- Canning, E.U. (1982) An evaluation of protozoal characteristics in relation to biological control of pests. *Parasitology* **84**, 119-149.
- Canning, E.U. *et al.* (2001) *Flabelliforma montana* (Phylum Microsporidia) from *Phlebotomus ariasi* (Diptera, Psychodidae): ultrastructural observations and phylogenetic relationships. *Europ J Protistol* **37**, 207-221.
- Canning, E.U. *et al.* (2005) *Microgemma vivaresi* n. sp. (Microsporidia, Tetramicidae), infecting liver and skeletal muscle of sea scorpions, *Taurulus bubalis* (Euphrasen 1786) (Osteichthyes, Cottidae), an Inshore, littoral fish. *J Eukaryot Microbiol* **52**, 123-131.
- Carvalho, C.J., Silva, E.B., Franco, J.C. & Mexia, A. (2000) Utilização de *Leptomastix dactylopii* Howard (Hymenoptera: Encyrtidae) na limitação de *Planococcus citri* (Risso) (Homoptera: Pseudococcidae) em Portugal continental. In: *A importância da protecção integrada numa agricultura sustentável. IV Encontro Nacional de Protecção Integrada*. Ilha Terceira. 3-4 Outubro de 1997. pp. 553-558.
- Carvalho, J. Passos (1986) *Introdução à Entomologia Agrícola*. Fundação Calouste Gulbenkian. 361pp.
- Carvalho, J. Passos (1990) Entomofauna dos Citrinos e Protecção Integrada. *Agros* **53**, 9-15.
- Carvalho, J. Passos (1994) Cochonilhas dos citrinos em Portugal. In: *Cong Citri Silves*. Silves. pp. 183-192.
- Carvalho, J.P., Franco, J.C., Aguiar, F. & Soares, A.O. (1996) Insect pests of citrus in Portugal. In: *Proc Int Soc Citriculture*. Sun City, RSA. pp. 613-618.

Cavalier-Smith, T. (1993) Kingdom Protozoa and Its 18 Phyla. *Microbiological Reviews* **57** (4), 953-994.

Cavalier-Smith, T. (1998) A revised six-kingdom system of life. *Biol Rev* **73**, 203-266.

Chandler, D., Sunderland, K.D., Ball, B.V. & Davidson, G. (2001) Prospective Biological Control Agents of *Varroa destructor* n. sp., an Important Pest of the European Honeybee, *Apis mellifera*. *Biocontrol Science and Technology* **11**, 429-448.

Chaves, J.A.S. (1992) *Inimigos das culturas*. 2ª Edição. Ministério da Agricultura. 507pp.

Cox, J.M. & Ben-Dov, Y. (1986) Planococcine mealybugs of economic importance from the Mediterranean Basin and their distinction from a new African genus (Hemiptera: Pseudococcidae). *Bull ent Res* **76**, 481-489.

Cramer, H.H. (1967) Plant protection and world crop protection. *Bayer Pflanzenschutznachrichten* **20**, 1-524.

Croft, B.A. (1990) *Arthropod Biological Control Agents and Pesticides*. New York. John Wiley & Sons.

DeBach, P. (1974) *Biological control by natural enemies*. London. Cambridge University Press. 323pp.

Dent, D. (1991) *Insect Pest Management*. UK. CAB International. 604pp.

Didier, E.S. (2005) Microsporidiosis: An emerging and opportunistic infection in humans and animals. *Acta Tropica* **94**, 61-76.

Doutt, R.L. (1952) Biological Control of *Planococcus citri* on Commercial Greenhouse *Stephanotis*. *Journal of Economic Entomology* **45**, 343-344.

Downie, D.A. & Gullan, P.J. (2004) Phylogenetic analysis of mealybugs (Hemiptera: Coccoidea: Pseudococcidae) based on DNA sequences from three nuclear genes, and a review of the higher classification. *Systematic Entomology* **29**, 238-259.

Down, R.E., Bell, H.A., Kirkbride-Smith, A.E. & Edwards, J.P. (2004a) The pathogenicity of *Vairimorpha necatrix* (Microspora: Microsporidia) against the tomato moth, *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera: Noctuidae) and its potential use for the control of lepidopteran glasshouse pests. *Pest Management Science* **60**, 755-764.

Ekbom, B.S. & Pickering, J. (1990) Pathogenic fungal dynamics in a fall population of the blackmargined aphid (*Monellia caryella*). *Entomologia Experimentalis et Applicata* **57**, 29-37.

FAO/IPPC (1996) (Food and Agriculture Organization, International Plant Protection Convention). *Code of Conduct for the Import and Release of Exotic Biological Control Agents*. Rome, Italy. IPPC Secretariat, FAO.

- Figueiredo, E.T.L. (1997). *Entomopatogénios e bio-insecticidas*. Provas de Aptidão Pedagógica e Capacidade Científica. Universidade Técnica de Lisboa. Instituto Superior de Agronomia. 355pp.
- Figueiredo, A.C., Barroso, J.M., Pedro, L.M. & Oliveira, M.M. (2001) *Guia Prático de Biologia Celular*. Lisboa. Associação de Estudantes da Faculdade de Ciências. 74pp.
- Franco, J.C. & Carvalho, J. Passos (1990). As cochonilhas-algodão dos citrinos (Homoptera: Pseudococcidae) em Portugal. In: AFH & SECH (eds) I Congresso Ibérico de Ciências Hortícolas, Lisboa 1990. *Actas de Horticultura*, **6**: 75-81.
- Franco, J.C. (1992) Citrus phenology as a basis to study the population dynamics of the citrus mealybug complex in Portugal. In: Tribulato, E., Gentile, A. & Reforgiato, G. (eds) *Proc Int Soc Citriculture*. Acireale, Itália. pp.929-930.
- Franco, J.C., Magro, A. & Carvalho, C.J. (1994) Situação da luta biológica contra as cochonilhas algodão (Homoptera; Pseudococcidae) em pomares de citrinos. In: *II Encontro Nacional de Protecção Integrada*. Anais da UTAD (**5**)1, 405-412.
- Franco, J.C., Silva, E.B. & Passos de Carvalho, J. (2000) *Cochonilhas-algodão (Hemiptera: Pseudococcidae) associadas aos citrinos em Portugal*. Lisboa. ISA Press. 142pp.
- Franco, J.C., Russo, A., Suma, P., Silva, E.B., Dunkelblum, E. & Mendel, Z. (2001) Monitoring strategies for the citrus mealybug in citrus orchards. *Boll Zool agr Bachic* **33**, 297-303.
- Franco, J.C., Suma, P., Silva, E.B., Blumberg, D. & Mendel, Z. (2004) Management strategies of mealybug pests of citrus in mediterranean countries. *Phytoparasitica* **32**(5), 507-522.
- Franco, J.C., Ramos, A.P. & Moreira, I. (eds) (2006) *Infra-estruturas ecológicas e protecção biológica: caso dos citrinos*. Lisboa. ISA Press. 176pp.
- Franzen, C. & Muller, A. (1999) Molecular Techniques for Detection, Species Differentiation, and Phylogenetic Analysis of Microsporidia. *Clinical Microbiology Reviews* **12**(2), 243-285.
- Franzen, C. (2004) Microsporidia: how can they invade other cells. *TRENDS in Parasitology* **20**(6).
- Franzen, C. (2008) Microsporidia: A Review of 150 Years of Research. *The Open Parasitology Journal* **2**, 1-34.
- Frescata, C. (2004) *Protecção contra pragas sem luta química*. Publicações Europa-América. 169pp.
- Gillott, C. (1980) *Entomology*. New York. Plenum Press. 729pp.

Graham, L. & Orenstein, J.M. (2007) Processing tissue and cells for transmission electron microscopy in diagnostic pathology and research. *Nature Protocols* **2**(10), 2439-2450.

Guimarães, J.A.M. (1973) *Catálogo das Pragas das Culturas em Portugal Continental (edição provisória)*. Direcção-Geral dos Serviços Agrícolas (Laboratório de Fitofarmacologia). Comissão Reguladora dos Produtos Químicos e Farmacêuticos. pp.289-294.

Hajek, A.E., McManus, M.L. & Júnior, I.D. (2007) A review of introductions of pathogens and nematodes for classical biological control of insects and mites. *Biological Control* **41**, 1-13.

Henry, J.E., Oma, E.A. & Onsager, J.A. (1978) Relative effectiveness of ULV spray applications of spores of *Nosema locustae* against grasshoppers. *Journal of Economic Entomology* **71**, 629-632.

Henry, J.E. (1981) Natural and applied control of insects by protozoa. *Annual Review of Entomology* **26**, 49-73.

Hibbett, D. & *et al.* (2007) A higher-level phylogenetic classification of the *Fungi*. *Mycological research* **111**, 509-547.

Higes, M., Martín, R. & Meana, A. (2006) *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *Journal of Invertebrate Pathology* **92**, 93-95.

Hirt, R.P., John M., L.J., Healy, B., Dorey, M.W., Doolittle, W.F. & Embley, T.M. (1999) Microsporidia are related to Fungi: Evidence from the largest subunit of RNA polymerase II and other proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 580-585.

Huffaker, C.B. (1988) Ecology of Insect Pest Control. In: *Sixth International Citrus Congress*. Goren, R. & Mendel, K. (eds.) Tel Aviv, Israel. Balaban Publishers. pp.1047-1066.

INE (2007) *CITRINOS*. GPP. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas.31pp.

Islam, K.S., Perera, H.A.S. & Copland, M.J.W. (1997) The effects of parasitism by an encyrtid parasitoid, *Anagyrus pseudococci* on the survival, reproduction and physiological changes of the mealybug, *Planococcus citri*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **34**, 77-83.

Jacobs, S.E. (1951) Bacteriological control of the flour moth, *Ephestia kuehniella* Z. *Proceedings of the Society of Applied Bacteriology* **13**, 83-91.

James, T.Y. *et al.* (2006) Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* **443**, 818-822.

- Johny, S., Kanginakudru, S., Muralirangan, M.C. & Nagaraju, J. (2006) Morphological and molecular characterization of a new microsporidian (Protozoa: Microsporidia) isolated from *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae). *Parasitology* **132**, 803-814.
- Katsoyannos, P. (1993) IPM for citrus insect pests in northern mediterranean countries. *FAO Plant Protection Bulletin* **41**, 177-194.
- Katsoyannos, B.I., Kouloussis, N.A. and Papadopoulos, N.T. (1996) Response of *Ceratitis capitata* to citrus chemicals under semi-natural conditions. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **82**, 181-188.
- Keeling, P.J. & Fast, N.M. (2002) MICROSPORIDIA: Biology and Evolution of Highly Reduced Intracellular Parasites. *Annu Rev Microbiol* **56**, 93-116.
- Knell, R.J. & Webberley, K.M. (2004) Sexually transmitted diseases of insects: distribution, evolution, ecology and host behaviour. *Biol Rev* **79**, 557-581.
- Kosztarab, M. (1996) *Scale insects of Northeastern North America. Identification, Biology and distribution*. Martinsville. 650pp.
- Krishnamoorthy, A. & Singh, S.P. (1987) Biological control of citrus mealybug, *Planococcus citri* with an introduced parasite *Leptomastix dactylopii* in India. *Entomophaga* **32**, 143-148.
- Lacey, L.A. & Goettel, M.S. (1995) Current Developments in Microbial Control of Insect Pests and Prospects for the Early 21st Century. *Entomophaga* **40**(1), 3-27.
- Lacey, L.A., Frutos, R., Kaya, H.K. & Vails, P. (2001) Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future? *Biological Control* **21**, 230-248.
- Lacey, L.A. & Shapiro-Ilan, D.I. (2003) The potencial role for microbial control of orchard insect pests in sustainable agriculture. *Food, Agriculture and Environment* **1**, pp.326-331.
- Lange, C.E. & De Wysiechi, M.L. (1996) The Fate of *Nosema locustae* (Microsporida: Nosematidae) in Argentine Grasshoppers (Orthoptera: Acrididae). *Biological Control* **7**, 24-29.
- Lange, C.E. (2003) Long-term of Occurrence of *Nosema locustae* and *Perezia dichroplusae* (Microsporidia) in Grasshoppers (Orthoptera: Acrididae) of the Pampas, Argentina. *Acta Protozool* **42**, 309-315.
- Larsson, J.I.R. (2005) Fixation of microsporidian spores for electron microscopy. *Journal of Invertebrate Pathology* **90**, 47-50.
- Lenira, V.C.S.-C., Reis, P.R. & Souza, J.C. (2002) Sobre a Nomenclatura das Espécies de Cochonilhas-Farinhas do Cafeeiro nos Estados de Minas Gerais e Espírito Santo, Brasil. *Neotropical Entomology* **31**, 333-334.

- Lewis, L.C., Sumerford, D.V., Bing, L.A. & Gunnarson, R.D. (2006) Dynamics of *Nosema pyrausta* in natural populations of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*: A six-year study. *BioControl* **51**, 627-642.
- Mabberley, D.J. (1997) A classification for edible Citrus (Rutaceae). *Telopea* **7**(2).
- Magalhães, N., Lobo, M.L., Antunes, F. & Matos, O. (2006) Aves e cães como potencial fonte de infecção zoonótica por microsporídeos para o Homem. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* **101**, 69-75.
- Martins, F.M., Mendonça, T.R., Lavadinho, A.M.P. & Vieira, M.M. (2002) Entomofauna num pomar de limoeiros, no Escaroupim (Ribatejo), em Portugal. *Bol San Veg Plagas* **28**, 435-443
- Mathis, A., Weber, R. & Deplazes, P. (2005) Zoonotic Potential of the Microsporidia. *Clinical Microbiology Reviews* **18**(3), 423-445.
- McIvor, C.A. & Mallone, L.A. (1995) *Nosema bombi*, a microsporidian pathogen of the bumble bee *Bombus terrestris* (L.). *New Zealand Journal of Zoology* **22**, 25-31.
- Méténier, G. & Vivarès, C. (2001) Molecular characteristics and physiology of microsporidia. *Microbes and Infection* **3**, 407-415.
- Mieli, M., Garcia, J.J. & Becnel, J.J. (2000) Life cycle and Description of *Amblyospora camposi* n. sp. (Microsporidia: Amblyosporidae) in the Mosquito *Culex renatoi* (Diptera, Culicidae) and the Copepod *Paracyclops fimbriatus fimbriatus* (Copepoda, Cyclopidae). *J Eukaryot Microbiol* **47**(6), 575-580.
- Ni, X., Backus, E.A. & Maddox, J.V. (1995) A new Microsporidium, *Nosema empoasca* n. sp., from *Empoasca fabae* (Harris) (Homoptera: Auchenorrhyncha: Cicadellidae). *Journal of Invertebrate Pathology* **66**, 52-59.
- Oerke, E.-C. (2005) Centenary Review. Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Science*, 1-13
- Pimentel, D. (1995) Amounts of Pesticides Reaching Target Pests: Environmental Impacts and Ethics. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics* **8**, 17-29.
- Quartau, J.A. (1984) Classificação e sinopse dos hexápodes actuais (Hexapoda ou Insecta sensu lato). *Soc Port Ciênc Nat*. Lisboa.
- Rebelo, M.T. (2002) *Mechanisms underlying the water hyacinth (Eichhornia crassipes)-weevils (Neochetina bruchi and N. eichhorniae)-microsporidia (Microsporidium sp.) association: its importance on integrated pest management strategies*. Universidade de Lisboa. Faculdade de Ciências. 178pp.
- Rose, M. (1988) Twenty Years of Biological Control Success on *Citrus* in the United States. In: *Sixth International Citrus Congress*. Goren, R. & Mendel, K. (eds.) Tel Aviv, Israel. Balaban Publishers. pp.1153-1161.

Salema, R. & Santos, I. (1992) *Microscopia Electrónica de Transmissão Instrumentação e Técnicas para Material Biológico*. Lisboa. Instituto Nacional de Investigação Científica. 252pp.

Samways, M.J. (1997) Classical Biological Control and biodiversity conservation: what risks are we prepared to accept? *Biodiversity and Conservation* **6**, 1309-1316.

Schottelius, J. *et al.* (2000) Presentation by scanning electron microscopy of the life cycle of microsporidia of the genus *Encephalitozoon*. *Microbes and Infection* **2**, 1401-1406.

Shrewsbury, P.M., Bejleri, K. & Lea-Cox, J.D. (2002) Integrating Cultural Management Practices and Biological Control to Suppress Citrus Mealybug. In: *Proc XXVI IHC - Protected Cultivation*. Papadopoulos, A.P. (ed.) *Acta Hort.* **633**, ISHS (2004). pp.425-434.

Silva, A. (1951) *Contribuição para o estudo da Sistemática, Morfologia, Biologia e Ecologia da Icerya Purchasi Mask, em Portugal*. Relatório final do curso de Engenheiro-Agrônomo. Universidade Técnica de Lisboa. Instituto Superior de Agronomia. 152pp.

Silva, J.C.F.S. (1997) *Contribuição para a protecção integrada em citrinos. Caso das cochonilhas-algodao (Hemiptera, Pseudococcidae)*. Doutoramento em Engenharia Agronómica. Universidade Técnica de Lisboa. Instituto Superior de Agronomia. 359pp.

Silva, E.M.B. (2000) *Cálculo de prejuízos provocados por Planococcus citri (Risso) em citrinos*. Doutoramento em Engenharia Agronómica. Universidade Técnica de Lisboa. Instituto Superior de Agronomia. 255pp.

Sokolova, Y.Y., Kryukova, N.A., Glupov, V.V. & Fuxa, J.R. (2006) *Systemostrema alba* Larsson 1988 (Microsporidia, Thelohaniidae) in the Dragonfly *Aeshna viridis* (Odonata, Aeshnidae) from South Siberia: Morphology and Molecular Characterization. *J Eukaryot Microbiol* **53**(1), 49-57.

Sokolova, Y.Y. & Lange, C.E. (2002) An Ultrastructural Study of *Nosema locustae* Canning (Microsporidia) from Three Species of Acrididae (Orthoptera). *Acta Protozool* **41**, 229-237.

Solter, L.F. & Maddox, J.V. (1998) Physiological Host Specificity of Microsporidia as an indicator of Ecological Host Specificity. *Journal of Invertebrate Pathology* **71**, 207-216.

Sprague, V. & Becnel, J.J. (1998) Note on the Name-Author-Date combination for the taxon Microsporidies Balbiani, 1882, when ranked as a Phylum. *Journal of Invertebrate Pathology* **71**, 91-94.

Tanada, Y. (1959) Microbial Control of Insect Pests. *Annual Review of Entomology* **4**, 277-302.



Tingle, C.C.D. & Copland, M.J.W. (1989) Progeny production and adult longevity of the mealybug parasitoids *Anagyrus pseudococci*, *Leptomastix dactylopii*, and *Leptomastidea abnormis* [Hym.: Encyrtidae] in relation to temperature. *Entomophaga* **34**, 111-120.

Tonka, T. & Weiser, J. (2000) *Becnelia sigarae* gen. n., sp. n. Isolated from Testes of the Water Boatmen, *Sigara lateralis* (Heteroptera: Corixidae) in the Czech Republic. *Acta Protozool* **39**, 241-252.

Tranfaglia, A., Franco, J.C., Spiciarelli, R. & Battaglia, D. (1992) Prime introduzioni in Portogallo di *Leptomastix dactylopii* How. per prove di lotta biologica al *Planococcus citri* (Risso). *Inf Agrar* **43**:71-72.

Trichilo, P.J. & Wilson, L.T. (1993) An ecosystem analysis of spider and mite outbreaks: Physiological stimulation or natural enemy suppression. *Experimental and Applied Acarology* **17**, 291-314.

Undeen, A.H. (1997) *Microsporidia (Protozoa): A Handbook of Biology and Research Techniques*.<http://www.modares.ac.ir/elearning/Dalimi/Proto/Lectures/week15/content.htm> (data de consulta: 28 de Outubro de 2008).

Van Driesche, R.G. & Bellows Jr., T.S. (1996) *Biological Control*. Chapman & Hall. 539pp.

Vávra, J. & Larsson, J.I.R. (1999) Structure of the microsporidia. In: *The Microsporidia and the Microsporidiosis*. Wittner, M. (ed.) Washington, D.C. American Society for Microbiology. pp.7-84.

Vávra, J., et al. (2006) *Vairimorpha disparis* n. comb. (Microsporidia: Burenellidae): A Redescription and Taxonomic Revision of the *Thelohania disparis* Timofejeva 1956, a Microsporidian Parasite of the Gypsy Moth *Lymantria dispar* (L.) (Lepidoptera: Lymantriidae). *J Eukaryot Microbiol* **53**(4), 292-304.

Viggiani, G. (1988) Citrus Pests in the Mediterranean Basin. In: *Sixth International Citrus Congress*. Goren, R. & Mendel, K. (eds.) Tel Aviv, Israel. Balaban Publishers. pp.1067-1073.

Wittner, M. (1999) Historic Perspective on the Microsporidia: Expanding Horizons. In: *The Microsporidia and Microsporidiosis*. Wittner, M. (ed.). Washington, D.C. American Society for Microbiology. pp.1-6.

Yaman, M. & Radek, R. (2003) *Nosema chaetocnema* sp. n. (Microspora: Nosematidae), a Microsporidian Parasite of *Chaetocnema tibialis* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Acta Protozoologica* **42**, 231-237.

## Anexos

### Anexo I: Chave de identificação no campo de Pseudococcídeos associados aos citrinos em Portugal (adaptado de Franco *et al.*, 2000)

1. Dorso não uniformemente coberto por partículas cerosas, sendo visível pelo menos uma faixa longitudinal, mais escura (deposição de cera menos intensa).....2
  - Dorso uniformemente coberto por partículas cerosas; comprimento do penúltimo par de filamentos caudais até  $\frac{1}{4}$  da dimensão do corpo.....*Pseudococcus viburni* (Signoret)
  
- 2(1). Dorso com uma faixa longitudinal.....3
  - Dorso com duas faixas longitudinais; comprimento do penúltimo par de filamentos cerosos caudais de  $\frac{1}{8}$  a  $\frac{1}{10}$  da dimensão do corpo; último par de forma cónica .....*Pseudococcus calceoraiiae* (Maskell)
  
- 3(2). Penúltimo par de filamentos cerosos caudais com cerca de metade da dimensão do corpo; último par normalmente de dimensão igual ou superior à do corpo.....*Pseudococcus longispinus* (Targioni Tozzeti)
  - Último par de filamentos cerosos caudais de forma cónica e cujo comprimento não ultrapassa  $\frac{1}{4}$  da dimensão do corpo.....*Planococcus citri* (Risso)

**Anexo II: Preparação dos reagentes para Microscopia Electrónica** (adaptado de Salema & Santos, 1992)

**1. Preparação do tampão Cacodilato de Sódio (0,1M; pH 7,2)**

**Soluções “stock”**

**Sol. A** – Cacodilato de sódio (pó) ----- 4,28g  
dH<sub>2</sub>O até ----- 100mL  
- dissolver bem e guardar a 4°C

**Sol. B** – ácido clorídrico ----- 0,365mL  
dH<sub>2</sub>O até ----- 100mL  
- dissolver bem e guardar a 4°C

**Tampão “stock” (0,1M - pH 7,0-7,2)**

Sol. A ----- 100mL  
Sol. B----- 16mL

Corrigir o pH e perfazer com:  
dH<sub>2</sub>O até----- 200mL

**2. Preparação do fixador glutaraldeído (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>) a 2,5%**

Solução inicial:

- 10 ampolas congeladas
- 1ml glutaraldeído 25% / ampola

Para obtenção da solução fixadora a 2,5% prepara-se a quantidade necessária na proporção 1ml de glutaraldeído a 25% : 10ml de tampão cacodilato de sódio.

**3. Preparação do pós-fixador tetróxido de ósmio (OsO<sub>4</sub>) a 2%**

Solução inicial:

- 1g tetróxido de ósmio 99,8% / ampola

Produto químico sólido que existe no comércio em cristais embalado em ampolas. Costuma preparar-se, a partir de 1g de tetróxido de ósmio com 25mL de água destilada, 25 ampolas de solução aquosa de tetróxido de ósmio a 4%.

Lava-se muito bem a ampola numa mistura cromo-sulfúrica alternadamente com água destilada, removendo-se o rótulo, e eliminando-se toda a matéria orgânica.

